

## THESIS / THÈSE

### MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

#### Application de la technique RNAi au silencage d'un rapporteur UR A4 chez Schizosaccharomyces pombe

STROOBANTS, Aurore

*Award date:*  
2004

[Link to publication](#)

#### General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

#### Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

**Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix**  
**FACULTE DES SCIENCES**  
Secrétariat du Département de Biologie  
Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR  
Téléphone: + 32(0)81.72.44.18 - Téléfax: + 32(0)81.72.44.20  
E-mail: joelle.jonet@fundp.ac.be - <http://www.fundp.ac.be/fundp.html>

**Application de la technique RNAi au silençage d'un rapporteur  
*ura4* chez *Schizosaccharomyces pombe***

STROOBANTS Aurore

## **Résumé**

Le système d'interférence par ARN (RNAi) a été découvert récemment. A la base, il semblerait avoir constitué un mécanisme de défense naturel de l'organisme en réponse à l'expression anormale de gènes, notamment ceux résultants de l'envahissement viral ou de transposons. A l'heure actuelle, il est exploité pour éteindre l'expression d'un gène afin de modifier de manière contrôlée un phénotype.

Ce système est induit par la présence d'ARN double-brin dans la cellule. Cet ARN double-brin est débité en siRNA (short interfering RNA) de 21-23 nucléotides par le complexe Dicer. Ces siRNA seront ensuite incorporés dans un complexe RISC (RNA Induced Silencing Complex) et le guideront vers l'ARNm homologue afin de le dégrader.

Le but de ce travail est de tester, de manière comparative, différentes techniques d'induction du système chez la levure *Schizosaccharomyces pombe*. Un gène rapporteur *ura4* est choisi comme cible du système. Trois vecteurs ont été construits pour induire la production de siRNA homologues de *ura4*. Un premier vecteur est destiné à produire le transcrit complet du gène *ura4* antisens, un deuxième vecteur une "hairpin" de 25 paires de bases et un troisième vecteur une "hairpin" de 350 paires de bases. Ces trois vecteurs, ainsi que des siRNA synthétiques, ont été transformés dans *S. pombe* afin d'induire le système RNAi. Aucune induction du système n'a été observée. Nous discutons les raisons possibles de cet échec.

Mémoire de licence en Sciences biologiques

Juin 2004

**Promoteur** : Professeur J. Vandenhaute

<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS COURANTES.....</b>	<b>3</b>
<b>AVANT-PROPOS.....</b>	<b>4</b>
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>5</b>
1. LE SYSTÈME RNAi .....	5
1.1 <i>Bref historique de la découverte du système RNAi.....</i>	5
1.2 <i>Le système RNAi naturel et son exploitation technique .....</i>	6
1.2.1 Production de l'ARN double-brin .....	6
1.2.1.1 Techniques de production.....	6
1.2.1.2 Limitations de la technique.....	7
1.2.2 Clivage de l'ARN double-brin.....	7
Dicer.....	7
Le système REGS.....	10
1.2.3 Amplification des siRNA .....	11
1.2.4 Dégradation des siRNA .....	12
1.2.5 Actions des siRNA .....	13
1.2.6 Dégradation de l'ARNm .....	14
1.2.6.1 Incorporation des siRNA dans RISC .....	14
1.2.6.2 Action de RISC .....	14
1.3 <i>Signification biologique.....</i>	15
1.4 <i>Le RNAi chez les mammifères .....</i>	16
1.5 <i>Résumé du fonctionnement du système RNAi .....</i>	17
1.5.1 Résumé des composants connus du système RNAi .....	17
1.5.2 Description générale du fonctionnement (figure 7) .....	18
<b>BUT DU TRAVAIL .....</b>	<b>20</b>
<b>RÉSULTATS .....</b>	<b>21</b>
1. LE SYSTÈME TÉTRACYCLINE .....	21
1.1 <i>La tétracycline.....</i>	21
1.2 <i>Les promoteurs régulables .....</i>	21
2. CONSTRUCTION DES OUTILS.....	24
2.1 <i>Ura4 antisens complet (pAUS2).....</i>	24
2.1.1 Construction du pAUS1 .....	24
2.1.2 Construction du pAUS4 .....	25
2.1.3 Construction du pAUS2 .....	26
2.2 <i>Petite hairpin ura4 (pAUS3).....</i>	27
2.3 <i>Grande hairpin ura4.....</i>	28
2.3.1 Le système "Gateway <sup>TM</sup> " et "Multisite Gateway <sup>TM</sup> " .....	28
2.3.2 Construction du vecteur pAUS7 .....	30
2.3.3 Construction du clone d'entrée pAUS5.....	31
2.3.4 Construction du clone d'entrée pAUS6.....	32
2.3.5 Construction du vecteur de destination pAUS8 .....	33
2.3.6 Construction du clone d'expression pAUS9 .....	34
2.4 <i>siRNA synthétiques.....</i>	35
3. TEST DU SILENÇAGE DE L'ARNM URA4 .....	36
3.1 <i>Essais d'extinction de l'ARNm d'ura4 par transformation des vecteurs dans S. pombe.....</i>	36
3.1.1 Observations des résultats .....	36
3.1.2 Analyse des résultats .....	39
3.2 <i>siRNA synthétiques.....</i>	39
<b>CONCLUSIONS .....</b>	<b>40</b>
<b>PERSPECTIVES.....</b>	<b>41</b>
<b>MATÉRIEL ET MÉTHODES.....</b>	<b>42</b>
1. MATÉRIEL .....	42
1.1 <i>Les tampons.....</i>	42
1.2 <i>Les solutions.....</i>	42
1.3 <i>Souches et plasmides.....</i>	44

---

1.3.1 Souches de bactéries (E.coli) .....	44
1.3.2 Souches de levures.....	45
1.3.3 Plasmides.....	45
2. MÉTHODES .....	47
2.1 <i>Techniques relatives à l'utilisation de bactéries</i> .....	47
2.1.1 Transformation par choc thermique $\text{CaCl}_2$ .....	47
2.1.2 Transformation par électroporation .....	47
2.2 <i>Techniques relatives à l'ADN</i> .....	48
2.2.1 La PCR ou "Polymérase Chain Reaction" .....	48
2.2.2 L'électrophorèse sur gel d'agarose .....	48
2.2.3 Récupération de l'ADN à partir d'un gel d'agarose (Kit MBI Fermentas) .....	49
2.2.4 Déphosphorylation d'ADN plasmidique restreint .....	49
2.2.5 Minipréparation d'ADN plasmidique.....	50
2.2.5.1 Minipréparations classiques.....	50
2.2.5.2 Minipréparations sur colonnes (Kit NucleoSpin® de la firme MN).....	50
2.2.6 Restriction d'ADN plasmidique.....	50
2.2.7 Réaction de "ligation" .....	51
2.2.8 La réaction de "ligation" avec le pGEM-t easy .....	51
2.2.9 Extraction d'ADNg de levure .....	51
2.2.10 Clonage Multisite Gateway™ .....	52
2.3 <i>Techniques relatives à l'utilisation des levures</i> .....	52
2.3.1 Transformation de levures par choc thermique .....	52
2.3.2 Transformation de levures par électroporation.....	53
<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>54</b>

<b>Liste des abréviations courantes</b>
---

Amp	Ampicilline
ATP	Adénosine TriPhosphate
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ARN	Acide RiboNucléique
ARNm	ARN messenger
dNTP	désoxyriboNucléoside 5' TriPhosphate
dsRNA	double strand RNA
D.O.	Densité Optique
Kan	Kanamycine
kb	10 <sup>3</sup> bases
miRNA	micro RNA
mM	milliMolaire
M	Molaire
ORF	Open Reading Frame
pb	paire de bases
PCR	Polymerase Chain Reaction
PTGS	Post Transcriptional Gene Silencing
RISC	RNA Inducing Silencing Complex
RNAi	RNA interference
Rpm	Rotations par minute
siRNA	short interfering RNA
ml	microlitre
mM	microMolaire

## Avant-propos

L'approche génétique consiste typiquement à invalider la fonction d'un gène. Pour cela, on peut, en principe, agir "*in vitro*" à plusieurs niveaux!:

- au niveau de la chromatine : certaines régions de l'ADN sont "silencées", c'est-à-dire que la transcription des gènes de cette région est réprimée. On comprend de mieux en mieux les mécanismes dits "épigénétiques" d'hétérochromatinisation et on peut stimuler celle-ci à une région voulue. Par ailleurs, la technique d'interférence par ARN (RNAi) peut "silencer" de manière spécifique l'expression de gènes ciblés.
- au niveau de l'ADN : on peut déléter un gène, le muter aléatoirement ou de manière ciblée, le surexprimer, le "disrupter" (c'est-à-dire enlever la partie 5' ou 3' terminales ou une partie centrale) ou le mettre sous contrôle d'un promoteur régulable.
- au niveau de l'ARN : on peut introduire le gène "antisens" ou utiliser le mécanisme d'interférence à ARN (RNAi).
- au niveau des protéines : on peut utiliser des inhibiteurs pour agir sur des réactions enzyme-substrat ou récepteur-ligand, induire la dégradation de la protéine par protéolyse suite, par exemple, à son ubiquitinylation grâce à la fusion de la protéine à un tag Degron (Kanemaki *et al.*, 2003) ou encore, tenter d'inactiver la protéine par des anticorps.

Dans ce mémoire, nous nous focaliserons sur le système RNAi et son action sur l'ARNm.

## Introduction

### 1. Le système RNAi

#### 1.1 Bref historique de la découverte du système RNAi

On sait aujourd'hui que le système d'interférence sur l'ARN (RNAi) utilise des "siRNA" (short interfering RNAs) pour diminuer l'expression de gènes de manière séquence spécifique. Ce "silencing" a été observé pour la première fois au début des années 90 mais personne n'en connaissait la cause. Il prit le nom de PTGS (Post Transcriptional Gene Silencing) chez les plantes, de "quelling" chez *Neurospora crassa* et de RNAi chez le nématode *Caenorhabditis elegans*. Ce "silencing" fut également observé par Guo *et al.* en 1995 après l'introduction d'oligonucléotides sens et antisens chez *C. elegans* (Schütze, N., 2004).

Ce n'est qu'en 1998 que Fire et ses collègues découvrirent que l'ARN double-brin (dsRNA) était à l'origine de ce "silencing". A l'époque, cette équipe testait l'efficacité de l'ARN antisens<sup>1</sup> chez *C. elegans*. Ils découvrirent que la présence simultanée d'ARN "sens" et "antisens" dans l'organisme causait un silencing spécifique très efficace et généralisé du gène cible et que ce silencing dépendait de l'assemblage de ces deux brins (Fire *et al.*, 1998).

En 1999, l'équipe de Baulcombe travaille sur le mécanisme PTGS induit par des virus et observe, pour la première fois, la formation de petits ARN complémentaires à l'ARN ciblé par le silencing. La question qui se posait alors était de savoir si ces petits ARN étaient les produits de dégradation de l'ARNm silencé ou étaient à l'origine du mécanisme de silencing (Hamilton *et al.*, 1999).

La réponse fut donnée par le groupe de Zamore suite à des études sur des embryons de *Drosophila melanogaster*. Ils ont démontré que, après leur injection, de longs ARN double-brin sont clivés en petits ARN de 21-23 nucléotides (nommés siRNA). Par ailleurs, l'injection directe de dsRNA synthétiques de 21-23 nucléotides induit effectivement la dégradation de l'ARNm qui leur est homologue (Zamore *et al.*, 2000).

L'équipe de Hammond démontre en parallèle que les siRNA sont associés à un complexe protéique RISC (RNA-Inducing Silencing Complex). Les siRNA sont donc impliqués dans le mécanisme de silencing (Hammond *et al.*, 2000).

En 2001, Bernstein *et al.*, travaillant sur la drosophile, montrent qu'une RNase de classe III produit des siRNA de 22 nucléotides à partir de longs ARN double-brin en présence d'ATP. Cette enzyme coupe le dsRNA en siRNA de taille uniforme. Le nom de Dicer, en résumé, est alors donné au complexe responsable de la production des siRNA (Bernstein *et al.*, 2001).

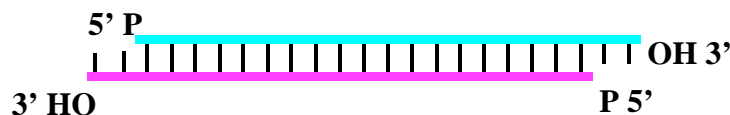
---

<sup>1</sup> On entend par antisens de l'ARNm, un oligonucléotide anti-complémentaire de celui-ci et donc capable de s'y hybrider. Un ARN antisens est donc un réactif susceptible d'interférer spécifiquement avec l'expression d'un gène donné.

Ainsi, il est apparu que le processus de silençage spécifique de certains ARNm nécessite la présence de petits dsRNA homologues. Ces petits ARN sont les siRNA et le système biologique responsable du mécanisme de silençage est appelé système RNAi.

## 1.2 Le système RNAi naturel et son exploitation technique

Le RNAi est un mécanisme naturellement présent chez certains organismes et est induit par la présence de dsRNA. Cet ARN double-brin est reconnu par le complexe Dicer qui le clive en siRNA. Ceux-ci se lient alors au complexe RISC et le guident vers les ARNm homologues qu'ils "silencent". Ce sont donc les siRNA qui donnent la spécificité au système (figure 1).



**Figure 1 :** Représentation d'un siRNA (short interfering RNA). Un siRNA est un ARN double-brin de 21-23 nucléotides de long possédant 2 nucléotides protrudants à l'extrémité 3' et une extrémité 5' phosphorylée.

### 1.2.1 Production de l'ARN double-brin

#### 1.2.1.1 Techniques de production

Une première technique pour induire le système RNAi consiste à introduire directement des siRNA synthétiques dans l'organisme.

Une deuxième technique utilise un plasmide comprenant la séquence entière (ou une partie) du gène à éteindre. La séquence clonée dans le plasmide pourra être exprimée de manière à obtenir un ARN sens et antisens, c'est-à-dire sous le contrôle de deux promoteurs à polarité inversée situés de chaque côté de l'insert. De cette façon, on produit directement les deux brins d'ARN qui pourront ensuite s'apparier. L'utilisation d'un plasmide contenant la séquence codant pour un ARN antisens sous le contrôle d'un seul promoteur peut également être envisagée. Une fois la séquence transcrite dans la cellule, l'ARN antisens s'hybridera à l'ARNm sens endogène pour former de l'ARN double-brin, substrat du système RNAi.

L'introduction simultanée de deux plasmides, l'un contenant une séquence codant pour l'ARN sens du gène et l'autre, une séquence codant pour l'antisens constitue également une possibilité. La présence simultanée des deux plasmides augmenterait l'efficacité du système RNAi (Raponi *et al.*, 2003).

Une dernière technique utilise un plasmide contenant une séquence qui code une "hairpin"<sup>2</sup> dont une branche est la séquence sens et l'autre l'antisens d'une portion de l'ORF cible. Lorsque l'ADN est transcrit, il y a appariement des parties sens et antisens de l'ARNm et formation d'"hairpins" d'ARN (Brummelkamp *et al.*, 2002; Schramke, V. *et al.*, 2003).

<sup>2</sup> On entend par "hairpin" un appariement de séquences complémentaires d'ARNm reliées par un linker.



Des "hairpins" peuvent naturellement être présentes dans la cellule. Les pré-RNA des gènes *let-7* (*lethal-7*) et *lin-4* (*lineage-abnormal-4*) en sont notamment deux exemples. Ces gènes extraordinairement petits et sans contenu codant des peptides sont impliqués dans le développement post-embryonnaire de *C. elegans*. Ces "hairpins" sont appelées "shRNA" (short hairpin RNA) et mesurent environ 70 nucléotides. Elles sont clivées par Dicer en "miRNA" (micro RNAs) simple-brin de 22 nucléotides (McManus *et al.*, 2002).

### 1.2.1.2 Limitations de la technique

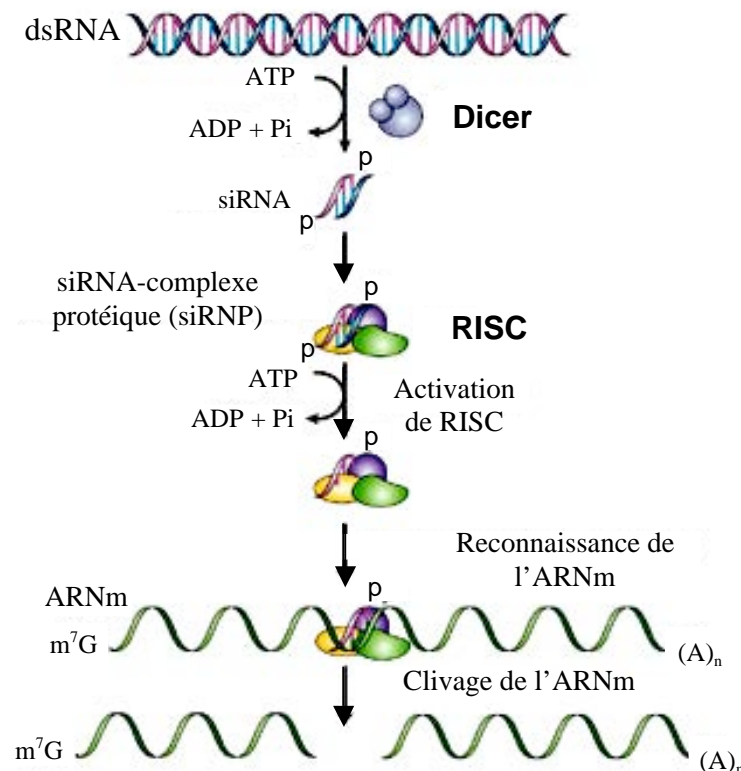
Pour obtenir l'invalidation de la fonction d'un gène codant une protéine donnée par le système RNAi dans un organisme, il faut obtenir une expression efficace et durable du RNAi ayant la taille, la concentration et la séquence qui convient (c'est-à-dire correspondant à des séquences présentes dans l'ARNm mûr ciblé) (Hannon, 2002).

En outre, le temps de vie de la protéine à supprimer est un paramètre important à prendre en compte. En effet, pour éteindre une protéine stable, il faudra exposer l'ARNm aux siRNA pendant une période plus longue pour obtenir un phénotype que pour une protéine dont la demi-vie est plus courte. Ainsi, chez les mammifères, une exposition de 18 heures suffit généralement pour réduire fortement l'activité de la plupart des gènes ciblés (McManus *et al.*, 2002).

### 1.2.2 Clivage de l'ARN double-brin

#### Dicer

Comme expliqué précédemment, l'ARN double-brin se trouve dans la cellule, il est reconnu par des enzymes à activité RNase de type III appartenant à un complexe appelé Dicer. L'ARN est clivé, de manière ATP dépendante, en petits ARN double-brin de 21-23 nucléotides. Ces petits ARN, nommés siRNA, possèdent deux nucléotides 3' protrudants (figure 1 et 2).

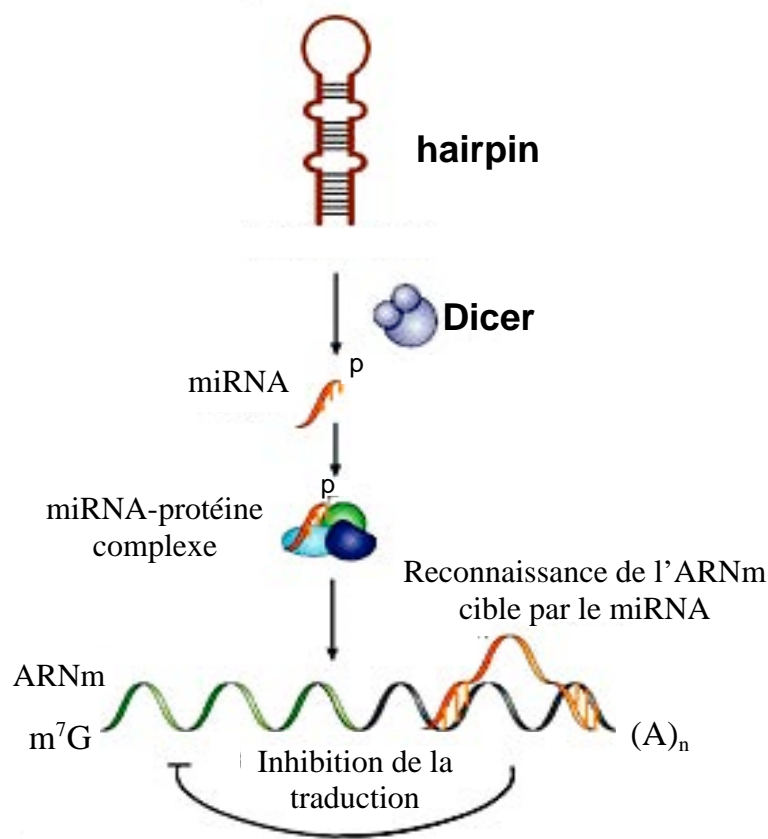


**Figure 2 :** Schéma de la voie d'action du siRNA. De l'ARN double-brin (dsRNA) active Dicer, qui le clive en siRNA (21-23 nucléotides, double-brin). Ces siRNA sont incorporés dans le complexe RISC sous forme de double-brin. Une fois le siRNA "désapparié", le brin ARN antisens guide le complexe RISC vers l'ARNm homologue afin de le cliver (Dykxhoorn *et al.*, 2003).

Les RNases de type III sont très conservées et présentes chez tous les organismes aptes au système RNAi. Des informations sur la structure de RNases III d'archaebactéries suggèrent que Dicer fonctionne sous forme d'un dimère antiparallèle. Dans ce modèle, seulement deux des quatre sites actifs seraient capables de cliver, produisant des siRNA de 22 nucléotides de long au lieu d'ARN de 11 nucléotides produits habituellement par des RNases similaires bactériennes. De plus, une étude récente a montré que Dicer débitait préférentiellement les dsRNA à partir des extrémités (Bernstein *et al.*, 2001). Le nom de Dicer vient du fait que l'enzyme clive l'ARN double-brin en petits ARN de taille uniforme.

Chez *C. elegans* et chez *D. melanogaster*, il a également été démontré que Dicer est actif sur l'ARN double-brin de grande taille à l'exclusion de tout autre activité nucléasique. Son action est grandement diminuée pour des substrats plus petits (Bernstein *et al.*, 2001).

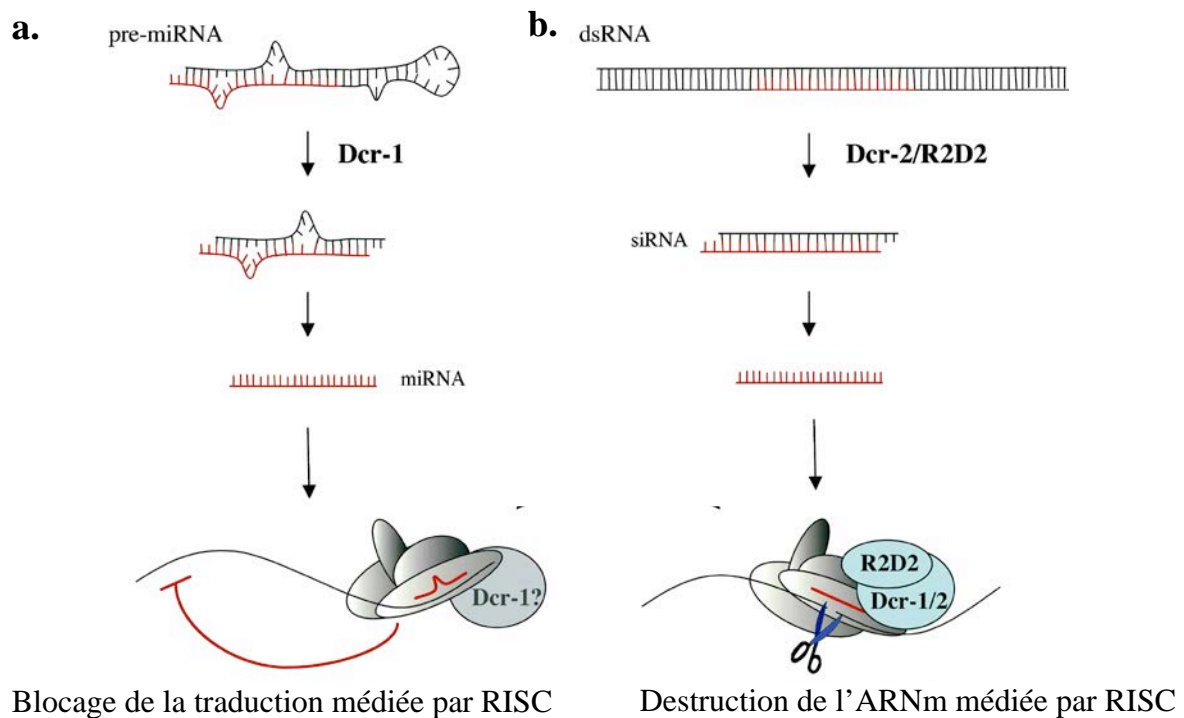
Néanmoins, les shRNA (small hairpin RNA) sont également la cible de Dicer et sont clivés en petits ARN simple-brin de 22 nucléotides, les miRNA dont la fonction est largement ignorée (cf. §1.2.1.1). Il a été montré, pour quelques cas, que les miRNA se lient aux régions UTR (untranslated regions) de l'ARNm cible et régulent sa traduction (figure 3). Des centaines de miRNA ont déjà été identifiés chez *C. elegans*, *Drosophila*, *S. pombe*, les plantes et les mammifères (Denli *et al.*, 2003).



**Figure 3 :** Schéma de la voie d'action du miRNA. Le précurseur ARN des miRNA est une "hairpin" d'environ 70 nucléotides qui est clivée par Dicer en miRNA. Ces miRNA sont ensuite incorporés sous forme de simple-brin dans le complexe RISC (miRNP) et ciblent l'ARNm en se liant aux régions UTR afin d'inhiber sa traduction (Dykxhoorn *et al.*, 2003).

Chaque monomère de Dicer possède également un domaine amino-terminal à activité hélicase de l'ARN pour séparer l'ARN double-brin, un domaine de liaison aux dsRNA et un domaine "PAZ" qui pourraient servir de domaine d'interaction avec d'autres protéines ou ARN. Le domaine PAZ est un domaine de 110 acides aminés présent également chez les protéines comme Piwi, Argo et Zwiille/Pinhead qui appartiennent à la même famille de protéines que Dicer (Bernstein *et al.*, 2001).

Notons qu'il existe deux et quatre Dicer chez la drosophile et *A. thaliana*, respectivement, contrairement à l'homme où il n'en existe qu'un. Chez *Drosophila*, les deux Dicers ont des fonctions différentes. Dicer-1 est spécialisé dans la production de miRNA et Dicer-2 dans les siRNA. Dicer-1 possède un domaine PAZ qui pourrait lui servir à faire le lien avec le précurseur miRNA tandis que Dicer-2 comprend un domaine hélicase qui lui permettrait de se déplacer le long de l'ARN double-brin. Notons aussi que Dicer-2 est lié à une autre protéine : R2D2 (cf. §1.2.6.1), laquelle interviendrait dans le recrutement de l'ARN double-brin (figure 4) (Lee *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2003).



**Figure 4 :** Modèle du "silencing" chez la drosophile. Les miRNA (a) et les siRNA (b) sont "processés" à partir d'ARN double-brin par Dicer-1 et Dicer-2, respectivement. Ils restent attachés à Dicer qui les introduit dans RISC grâce à R2D2 (Tijsterman *et al.*, 2004).

### Le système REGS

Récemment, une nouvelle technique de laboratoire, nommée REGS (Restriction Enzyme-Generated siRNA), a été proposée. Ce système astucieux consiste à générer de multiples siRNA fonctionnels à partir de n'importe quel ADNc. Il utilise des enzymes endonucléases qui, du fait du clivage qu'elles induisent à distance fixe de leur site de reconnaissance, sont capables d'engendrer des siRNA de taille (21 nucléotides) voulue.

REGS digère donc l'ADNc double-brin en fragments d'environ 21 nucléotides. Cette taille a l'avantage d'être inférieure à celle induisant la réponse aspécifique bien connue chez les mammifères (cf. §1.4). Les fragments générés ont une structure palindromique permettant de former des "hairpins" d'ARNm. Ces séquences sont clonées dans un vecteur pour permettre leur expression.

Ce système permet de produire une grande quantité de siRNA spécifiques d'un gène ou également de constituer des banques de siRNA pour tout le transcriptome (Sen *et al.*, 2004).

### 1.2.3 Amplification des siRNA

Il existe *in vivo* un système d'amplification des siRNA. Deux modèles ont déjà été proposés.

#### Premier modèle

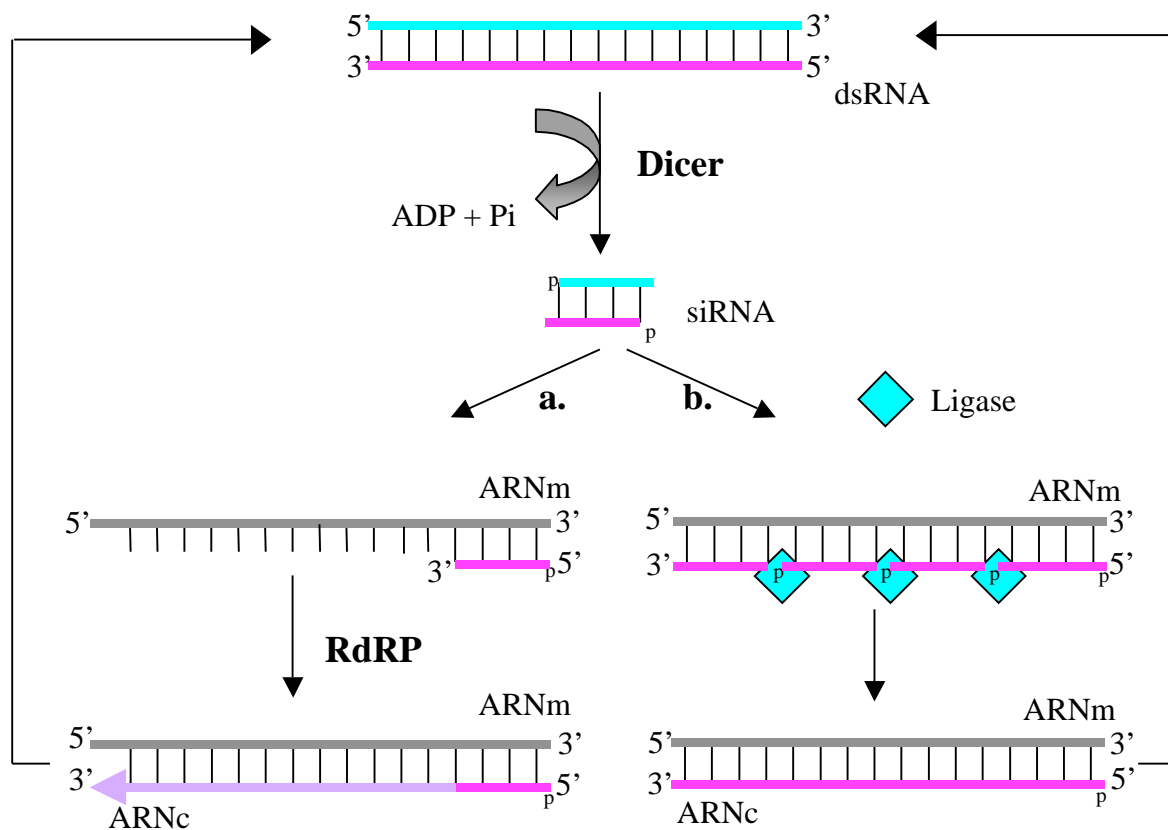
Le premier modèle se base sur une "RNA-dependent RNA Polymerase" (RdRP) qui amplifierait les dsRNA introduits dans la cellule et serait responsable de la grande efficacité du système RNAi. La RdRP allongerait un siRNA en un ARNc lorsqu'il s'apparie à l'ARNm afin de produire un nouveau dsRNA qui serait clivé par Dicer et produirait des siRNA spécifiques des régions voisines du siRNA de départ (figure 5a). Ce phénomène est appelé "transitive RNAi". Dans ce modèle, il peut donc y avoir un silençage presque complet du gène même si un petit nombre seulement de siRNA est introduit dans la cellule (Sijen *et al.*, 2001).

Il est indispensable que l'extrémité 3' du siRNA soit hydroxylée pour que la RdRP puisse utiliser le siRNA comme primer et l'étendre pour former un long dsRNA (Schwarz *et al.*, 2002).

Cette amplification a déjà été observée et étudiée chez les plantes ainsi que chez *C. elegans*, *N. crassa* et *Dictyostelium discoideum*. Elle a également été observée dans des extraits d'embryons de *Drosophila* même si aucun homologue de RdRP n'a été trouvé dans son génome. Il semblerait que la RdRP ne soit pas requise pour le bon fonctionnement du système RNAi chez *D. melanogaster* (Agrawal *et al.*, 2003). L'homologue de la RdRP est appelé QDE1 chez *N. crassa*, EGO1 chez *C. elegans*, SDE1 chez *A. thaliana* (Agrawal *et al.*, 2003).

#### Deuxième modèle

Le deuxième modèle se base sur l'hypothèse que les siRNA s'assembleraient le long de l'ARNm et seraient "ligués" par une RNA ligase pour générer un "ARNc" (ARN complémentaire). Cet ARNc et l'ARNm seraient alors clivés par Dicer en nouveaux siRNA. L'ATP est nécessaire pour catalyser la "ligation" aussi bien que pour le clivage par Dicer (figure 5b). Dans ce cas, un seul phosphate à l'extrémité 5' des siRNA suffit (Schwarz *et al.*, 2002).



**Figure 5 :** Deux modèles d'amplification des siRNA.

**a)** L'amplification des siRNA se fait par la RdRP (RNA-dependent RNA polymerase).

**b)** L'amplification du système RNAi est réalisée par la "ligation" de nombreux siRNA pour former un nouvel ARN double-brin.

ARNc : ARN complémentaire.

#### 1.2.4 Dégradation des siRNA

Il existe une RNase qui cible les siRNA, appelée ERI-1 (enhancers of RNAi). Elle a été découverte chez *C. elegans* au niveau des gonades et du système nerveux central, là où justement, le système RNAi fonctionnait moins bien. ERI-1 code une protéine qui se compose d'un domaine de liaison aux acides nucléiques appelé SAP/SAF-box et un domaine à activité exonucléase homologue au domaine DEDDh 3'Æ5' exonucléase.

La famille des nucléases DEDDh inclut la RNase T, l'oligoribonucléase et la sous-unité "proofreading" de la DNA polymérase III d'*E. coli*. La RNase T reconnaît le dsRNA avec une préférence de substrats pour ceux ayant une extrémité 3' protrudante. Les enzymes oligoribonucléases (Orn) d'*E. coli* sont requises pour la dégradation de l'ARNm.

Les domaines SAP/SAF-box montrent des similarités de structure avec les homéodomaines des protéines de liaison à l'ADN. Ainsi, le domaine SAP de ERI-1 suggère que celle-ci pourrait avoir une fonction dans le noyau. Néanmoins, elle a également été localisée dans le cytoplasme chez le ver. Ce qui mène à l'hypothèse que si ERI-1 a une fonction dans le noyau, celle-ci ne serait que transitoire. Une autre possibilité serait que le domaine SAP lierait l'ARN double-brin pour stabiliser les interactions entre l'ARN et le domaine nucléase.

Des orthologues putatifs de ERI-1 ont été identifiés chez *S. pombe* (SPBC3084.08) et chez les vertébrés. Chez l'homme, il s'appelle "3'hExo".

ERI-1 aurait donc pour fonction de limiter l'intensité du RNAi en agissant comme régulateur négatif, en particulier dans certains types de cellules et/ou de réguler la fonction endogène de la machinerie RNAi (Kennedy *et al.*, 2004).

### 1.2.5 Actions des siRNA

A priori, les siRNA peuvent inhiber l'expression du gène homologue de trois façons différentes : en ciblant la dégradation de l'ARNm (figure 2), en inhibant sa traduction (figure 3) ou en induisant des modifications chromatinienne ayant pour effet de limiter la transcription elle-même du gène.

La manière dont l'expression du gène sera inhibée au niveau de l'ARNm semble dépendante du degré de complémentarité entre les siRNA et cet ARNm. En effet, on a observé qu'une complémentarité parfaite induit généralement le silençage du gène par dégradation du messenger tandis qu'une complémentarité imparfaite entraîne une inhibition de la traduction de l'ARNm (Watson *et al.*, 2004). Néanmoins, dans le cas où l'ARNm est dégradé, un non appariement (mismatch) d'une ou de deux paire(s) de bases peut être toléré entre les siRNA et l'ARNm mais la dégradation de ce dernier sera partielle. Elle sera d'autant plus partielle que le "mismatch" se trouve près des extrémités du duplex (McManus *et al.*, 2002).

L'hétérochromatine constitutive consiste en une structure condensée de la chromatine contenant peu de gènes exprimés et une forte densité de transposons et de séquences répétées. Elle est présente principalement au niveau du centromère. Le mécanisme de formation de l'hétérochromatine s'effectue en deux étapes! : la nucléation puis l'expansion le long du chromosome. La nucléation fait intervenir une modification de l'extrémité!N terminale des histones. La formation d'hétérochromatine nécessite une hypoacétylation des histones et la méthylation de la lysine 9 de l'histone H3 (Grewal *et al.*, 2003). L'implication de la machinerie RNAi dans la formation de l'hétérochromatine au niveau du centromère a été démontrée récemment par l'équipe de Volpe chez *S. pombe*. Cette équipe a observé que, dans des mutants de Dicer, au niveau de la protéine Argonaute ou de la RdRP, la méthylation de la lysine 9 de l'histone 3 (marqueur de l'hétérochromatine) est réduite et que la méthylation de la lysine 4 de l'histone 3 (marqueur de l'euchromatine) est augmentée (Volpe *et al.*, 2002).

Le système RNAi peut également induire l'hétérochromatinisation de régions normalement euchromatiniennes. Un complexe de type RISC dans lequel la nucléase serait remplacée par un complexe de remodelage chromatinien serait ciblé sur les régions euchromatiniennes à convertir. Le siRNA permettrait d'effectuer la reconnaissance ou l'adressage spécifique du gène ou de la région cible. Selon un modèle alternatif, ce n'est qu'après cet adressage que le siRNA recruterait le complexe qui va induire la conversion de la chromatine en hétérochromatine (Grewal *et al.*, 2003).

Compte tenu du fait que nous nous focaliserons sur la dégradation de l'ARNm, c'est ce dernier processus qui est principalement développé ci-dessous.

## 1.2.6 Dégradation de l'ARNm

### 1.2.6.1 Incorporation des siRNA dans RISC

Chez *Drosophila*, les siRNA sont incorporés sous forme de simple-brin dans un complexe multiprotéique, le complexe RISC, grâce au complexe Dicer/R2D2. La protéine R2D2 est liée à Dicer-2 et forme un complexe stable et essentiel au bon fonctionnement du mécanisme RNAi. En effet, R2D2 a pour rôle de guider, avec Dicer, le brin antisens du siRNA vers le complexe RISC et de l'y incorporer. R2D2 a également pour fonction de lier le dsRNA pour que Dicer puisse le cliver en siRNA (figure 5). R2D2 stabilise aussi Dicer. Son nom vient du fait que R2D2 comprend deux domaines de liaison à l'ARN double-brin (R2) et qu'elle est associée à Dicer-2 (D2). Elle n'est jamais associée à Dicer-1 (chez la drosophile). R2D2 montre environ 30% d'identité avec la protéine RDE-4 de *C. elegans*. Cette dernière contient également des domaines de liaison en tandem à l'ARN double-brin et interagit avec Dicer, ce qui laisse à penser qu'elle est l'homologue de R2D2 chez *C. elegans* et y tiendrait le même rôle (Liu *et al.*, 2003).

### 1.2.6.2 Action de RISC

Pour entrer dans le complexe RISC, les siRNA simple-brin doivent être phosphorylés à leur extrémité 5'. Cette extrémité phosphorylée leur confère une protection contre la dégradation par RISC et augmente donc leur stabilité. Elle servirait également de point de référence à partir duquel le site de clivage est mesuré. Si le siRNA n'est pas phosphorylé, pour les siRNA synthétiques par exemple, le phosphate est ajouté par une kinase endogène (Nykänen *et al.*, 2001). Chez *Drosophila*, cette kinase phosphoryle le siRNA uniquement à l'état de double-brin tandis que chez l'homme, elle phosphoryle indifféremment à l'état de simple-brin ou double-brin (Schwarz *et al.*, 2002).

Quand le siRNA est incorporé dans RISC, les deux brins sont déroulés. La présence de cet ARN simple-brin dans ce complexe l'active grâce à l'utilisation d'ATP (Hannon 2002). Une fois le complexe activé, le brin "antisens" guide alors RISC vers l'ARNm qui lui est homologue afin de le cliver grâce à son activité endonucléase (figure 2). Le clivage de l'ARNm s'effectue en un site unique, positionné en vis-à-vis du milieu de la séquence du siRNA (Elbashir *et al.*, 2001). Ce clivage est catalysé par la formation d'un pont phosphodiester entre le complexe RISC et l'ARNm. Il nécessite également du  $Mg^{2+}$  (Schwarz *et al.*, 2004).

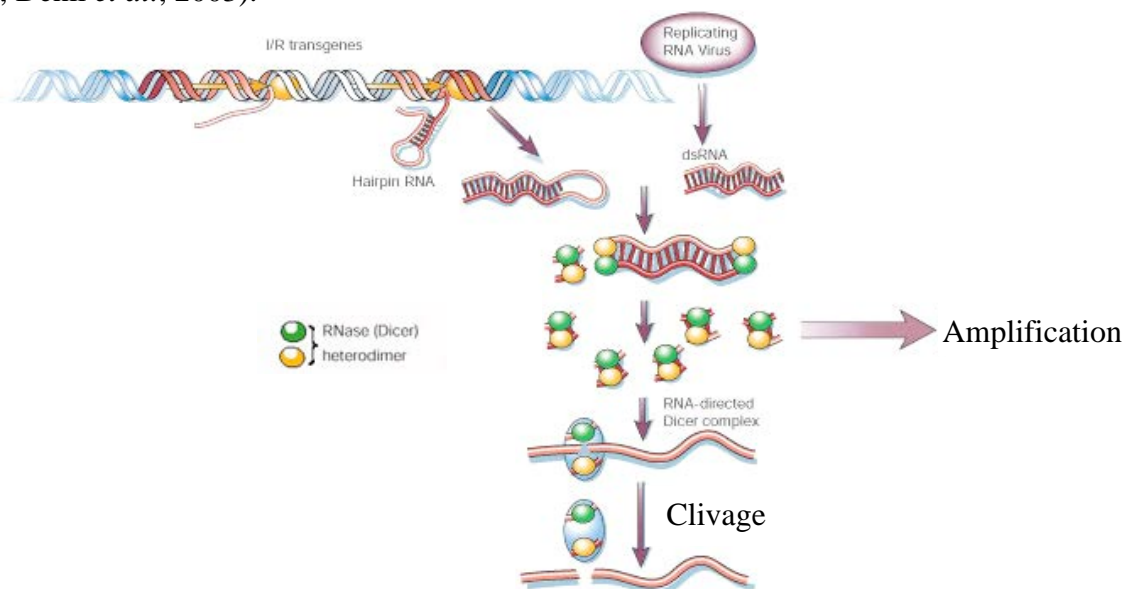
Le complexe RISC est composé du siRNA ou miRNA, de protéines de la famille "Argonaute" qui interagissent avec l'ARN, d'endonucléases responsables du clivage du messager (Hannon 2002) et d'autres protéines encore inconnues ou dont la fonction n'a pas encore été identifiée (McManus *et al.*, 2002), le tout formant une ribonucléoprotéine (RNP). La composition et la taille du complexe RISC varient en fonction de l'espèce, du type de cellule et du stade de différenciation développemental de la cellule (Denli *et al.*, 2003). L'ensemble ARNm – siRNA – protéines du complexe RISC a été nommé "siRNP" (small interfering RiboNucleoprotein Particle) (Agrawal *et al.*, 2003).



### 1.3 Signification biologique

L'existence de ce système au sein d'un organisme aurait pour but de le protéger contre des virus. En effet, pour beaucoup d'organismes, la source majeure de dsRNA est les virus à ARN (ex.: le rétrovirus HIV). L'ARN de ces virus forme de l'ARN double-brin intermédiaire pendant sa réplication, lequel serait la cible du système RNAi. Cette hypothèse a été démontrée par la création d'un mutant d'*A. thaliana* incapable de réaliser une réponse PTGS (RNAi chez les plantes) et devenu, de ce fait, hyper susceptible à l'infection virale (Bernstein *et al.*, 2001). Les virus, quant à eux, ont développé un mécanisme pour contrecarrer le système RNAi, les VSGS (Viral Suppressors of Gene Silencing). Ces VSGS connus sont actuellement au nombre de trois dont deux sont capables de supprimer partiellement ou complètement le "silencing". Le troisième agit seulement préventivement pour éviter le même "silencing". (Li *et al.*, 2001). Ces VSGS sont présents au moins chez les plantes et chez la drosophile (McManus *et al.*, 2002).

Le système RNAi protégerait également l'organisme contre les transgènes et joue ainsi le rôle de "système immunitaire" propre aux acides nucléiques. Ce rôle a été mis en évidence par l'équipe de Jorgensen en surexprimant des gènes de pigmentation afin d'intensifier la couleur de pétunias. A leur grande surprise, l'introduction de transgènes sous contrôle d'un promoteur fort causait l'apparition de taches incolores dans les plantes transformées au lieu de l'hyperpigmentation attendue. Au niveau de ces taches, le transgène ainsi que le locus endogène étaient éteints. La plupart des transgènes contiennent des IRs (Inverted Repeats) qui peuvent former des "hairpins". C'est l'apparition de l'ARN double-brin correspondant qui induirait leur silencing, ainsi que celui du locus endogène homologue, par RNAi. L'apparition d'ARN aberrants s'observe, de manière générale, lorsqu'un gène est transcrit à un haut niveau, déclenchant le système de protection ou d'immunité mentionnés (figure 6) (Waterhouse *et al.*, 2001; Denli *et al.*, 2003).



**Figure 6 :** Modèle général d'initiation et d'opération du système RNAi (établi essentiellement à partir de travaux effectués chez les plantes). De l'ARN double-brin est produit soit par un transgène possédant des IR (Inverted Repeats), engendrant une "hairpin" soit par un virus à ARN. Il est clivé en fragments de 22 nucléotides par Dicer. Ces fragments sont utilisés comme guides pour cliver l'ARN simple-brin homologue (Waterhouse *et al.*, 2001).

Ce même système RNAi, alerté par l'apparition de dsRNA aberrants, protègerait dès lors aussi des transposons qui sont en quelque sorte des formes de transgènes endogènes. Dans tout génome d'organismes eucaryotes, une bonne partie des séquences est formée par des éléments répétitifs dont de nombreuses copies de transposons. Ces éléments déstabilisent le génome de deux façons. Premièrement, les transposons sont potentiellement mutagènes et peuvent disrupter des gènes résidents. Deuxièmement, les transposons contiennent des sites capables d'être des sites de "crossing-overs".

Le mécanisme RNAi est utile pour "supprimer" ou induire une hétérochromatinisation de l'ADN porteur de ces séquences. Cette dernière action conduit au même effet de suppression de l'expression mais cette fois, au niveau transcriptionnel plutôt que traductionnel ou post-traductionnel (Bernstein *et al.*, 2001). Une étude sur *C. elegans* a démontré que dans une souche déficiente pour le RNAi, il y règne en effet une plus grande mobilité des transposons mais le mécanisme exact par lequel le RNAi contrôle la mobilité de ceux-ci n'est pas encore connu en détail (Denli *et al.*, 2003).

Lorsqu'un organisme comme une plante est infecté par des virus à ARN ou transformé par des transgènes, il y a accumulation d'ARN viraux simple-brin (éventuellement double-brin) ou d'ARN transgéniques. Une RdRP d'origine virale prendrait alors les ARN simple-brin comme "template" et synthétiserait l'ARN antisens pour former de l'ARN double-brin. C'est à ce moment que le système RNAi intervient en clivant ces ARN double-brin en siRNA (Waterhouse *et al.*, 2001; Agrawal *et al.*, 2003).

Outre le rôle originel propre du système RNAi pour la "défense", le système intervient également dans le mécanisme naturel de développement. En effet, certaines mutations dans des composants du système RNAi chez *A. thaliana* et *C. elegans* entraînent des problèmes de développement de certains organes. Les mutants les plus connus du système RNAi, qui furent aussi parmi les premiers créés chez *C. elegans*, sont *let-7* (*lethal-7*) et *lin-4* (*lineage-abnormal-4*). Le gène *let-7* produit un ARN non codant qui régule le timing du développement. Son précurseur ARN forme une "hairpin" de 70 nucléotides qui est "processée" en un stRNA (small temporal RNA) de 22 nucléotides de long (Bernstein *et al.*, 2001). Le mécanisme d'action de ces stRNA est celui des miRNA.

#### 1.4 Le RNAi chez les mammifères

Contrairement à ce qu'on observe lorsqu'on injecte de l'ARN double-brin chez les organismes tels que la drosophile ou *C. elegans*, l'introduction de longs dsRNA dans des cellules somatiques (mais pas embryonnaires) de mammifères entraîne généralement une réponse aspécifique, différente donc de celle qu'on attend du système RNAi.

Une des raisons est que l'introduction d'ARN double-brin dans la cellule de mammifère (si sa taille est supérieure à 30 nucléotides) induit la phosphorylation de EIF-2 $\alpha$  (Elongation Initiation Factor-2 $\alpha$ ) par la "RNA-dependent Protein Kinase R" (PKR), une enzyme qui fait partie de la machinerie de défense contre les virus chez les mammifères. Cette phosphorylation entraîne un arrêt de la biosynthèse de toutes les protéines, ce qui a pour conséquence la mort de la cellule par apoptose. Ce problème peut néanmoins être parfois contourné en introduisant directement des siRNA synthétiques dans les cellules. Ils iraient alors s'incorporer directement dans RISC et cibleraient la dégradation spécifique de l'ARNm homologue. Une autre solution est d'incorporer des vecteurs qui produisent de l'ARN double-

brin dans des lignées de cellules où ce système de phosphorylation PKR est manquant ou inactif. Cependant, dans beaucoup de cellules somatiques de mammifères, ces solutions provoqueraient quand même une réponse cytotoxique importante (Arenz *et al.*, 2003).

Il est à noter également que la technologie mise au point pour éteindre l'ARNm par le système RNAi est, jusqu'ici, moins efficace chez les mammifères. Non seulement, on ne peut pas introduire de longs dsRNA dans les cellules mais en plus, même lorsque cette limitation peut être contournée, l'efficacité de la technique est réduite pour diverses raisons. Notons d'abord que, comme on vient de le voir, les mammifères ne possèdent pas de mécanisme d'amplification, ce qui affecte négativement l'efficacité. De plus, l'intensité du silencing dépend également de l'efficacité de transfection des siRNA dans la cellule qui est généralement transitoire. Enfin, le RNAi ne peut se transmettre à la génération suivante, contrairement à ce qu'on observe par exemple chez le ver, la drosophile ou les plantes (Hannon 2002).

Néanmoins, de nouvelles techniques permettent une expression stable de siRNA dans des cellules de mammifères. Une de ces techniques utilise un vecteur nommé pSUPER. Ce vecteur permet une expression stable d'une petite "hairpin" d'ARN double-brin et donc, la production de siRNA. On observe ainsi une suppression de l'expression du gène cible permettant d'en étudier le phénotype qui en résulte. Une autre méthode de production de RNAi chez les mammifères est à l'étude pour le moment et fait appel à un virus transgénique qui infecterait n'importe quel type de cellule avec une efficacité de 100% et assure dès lors une dispersion du RNAi à travers les tissus de l'organisme traité.

Il restera néanmoins des facteurs limitants à toutes ces méthodes, que ce soit chez les mammifères ou les autres espèces. Ces facteurs hypothéquant l'efficacité du RNAi sont la demi-vie de la protéine cible, son abondance ainsi que le taux d'expression des gènes (cf. §1.2.1.2) (Arenz *et al.*, 2003). C'est la raison pour laquelle le "silencing" des gènes par RNAi, comme on l'appelle communément mais abusivement, est en réalité non un K.O. mais un "knock down" de l'expression de ceux-ci.

## 1.5 Résumé du fonctionnement du système RNAi

### 1.5.1 Résumé des composants connus du système RNAi

	<i>C. elegans</i>	<i>S. pombe</i>	<i>D. melanogaster</i>	<i>A. thaliana</i>	Mammifères
<b>Dicer</b>	+	+	+	+	+
<b>R2D2</b>	+	?	+	?	?
<b>RdRP</b>	+	?	+/-	+	-
<b>ERI-1</b>	+	+	?	?	+
<b>RISC</b>	+	+	+	+	+

Remarque : *Saccharomyces cerevisiae* ne possède pas de système fonctionnel.

### ***1.5.2 Description générale du fonctionnement (figure 7)***

Le système d'interférence à ARN (RNAi) est induit par l'introduction d'ARN double-brin dans la cellule. Cet ARN double-brin peut être d'origine exogène ou endogène. Le système peut également être activé par l'introduction directe de siRNA (short interfering RNA) synthétiques.

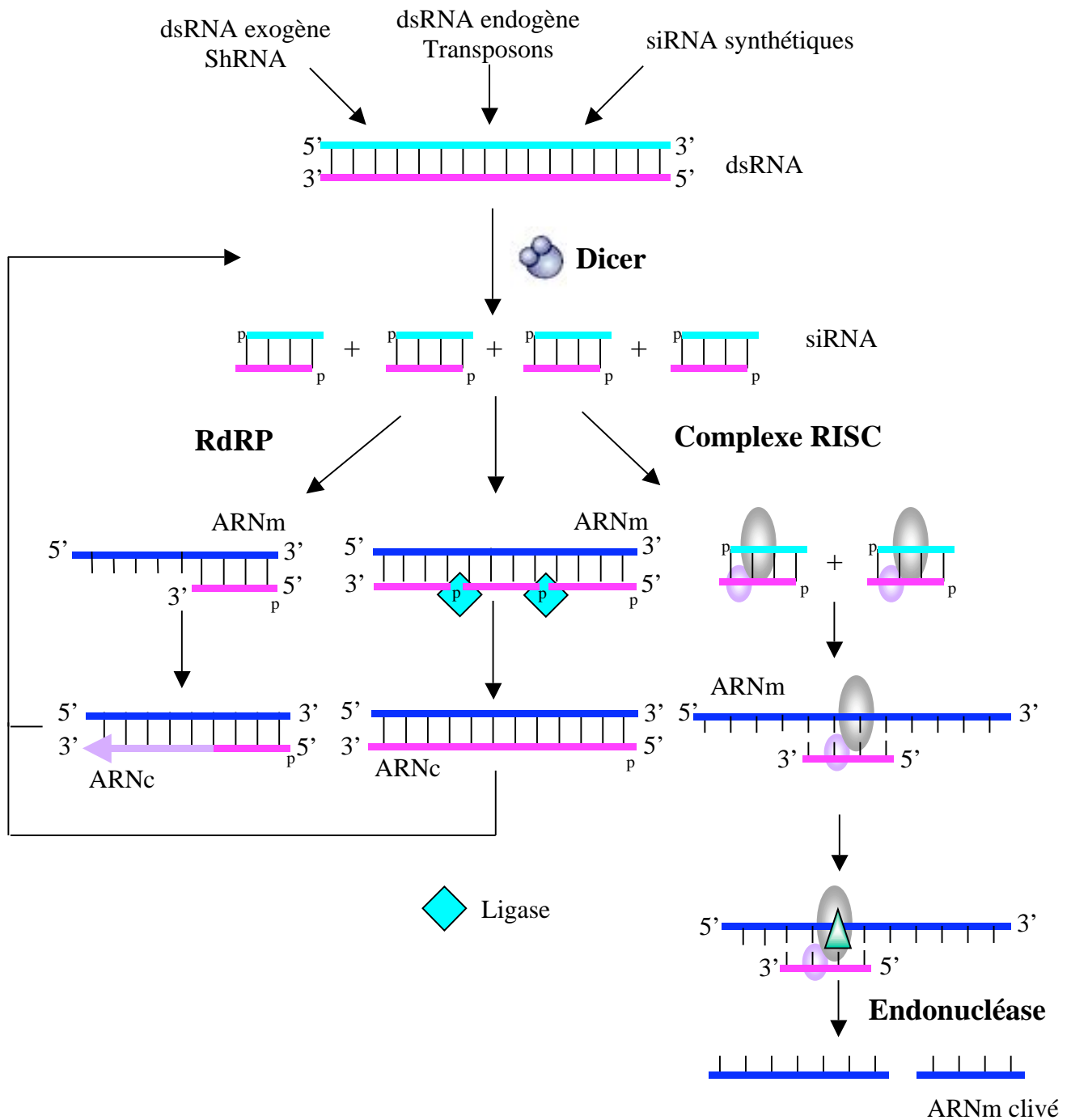
Quand l'ARN double-brin est dans la cellule, Dicer le reconnaît avec l'aide de la protéine R2D2 et le clive en siRNA de 21-23 nucléotides. Une fois le siRNA formé, Dicer va le dérouler grâce à son activité hélicase. A ce moment, différentes voies se présentent.

Dans la première voie, le brin antisens du siRNA reconnaît l'ARNm qui lui est homologue et s'y lie. Une RdRP (RNA dependent RNA Polymerase) allonge l'extrémité 3' hydroxylée de ce brin en prenant l'ARNm comme "template". Il y a alors formation d'un nouvel ARN double-brin, appelé ARNc (ARN complémentaire). Cet ARNc sera ensuite débité en siRNA par Dicer. Le processus est ainsi amplifié.

Dans la deuxième voie, des brins antisens de différents siRNA se lient à l'ARNm qui leur est homologue. Une ligase les assemblera, ce qui engendre la formation d'un nouvel ARN double-brin. Cet ARNc double brin sera ensuite débité en siRNA par Dicer. Le processus est ainsi également amplifié.

Dans la troisième voie, l'association du brin antisens du siRNA au complexe RISC (RNA Inducing Silencing Complex), grâce à l'intervention de Dicer/R2D2, permet de cibler ce complexe sur l'ARNm homologue et d'induire sa dégradation. Dans le cas particulier des miRNA, un système, en partie commun à celui représenté à la figure 7, conduit à l'inhibition de la traduction des ARNm.

Enfin, d'autres complexes, intervenant dans le silencing par hétérochromatinisation, seraient adressés spécifiquement à un locus d'ADN cible via leur composants siRNA.



**Figure 7!:** Schéma général du fonctionnement du système RNAi.

## But du travail

Le but de ce travail est de tenter d'induire le système d'interférence à ARN afin d'éteindre l'expression d'un gène choisi, ici *ura4*, chez la levure *S. pombe*. A cette fin, quatre méthodes vont être testées et évaluées comparativement.

La première méthode consiste à produire un ARNm antisens du gène *ura4* qui reconnaîtra l'ARNm endogène de ce gène, formant ainsi de l'ARN double-brin qui sera débité en siRNA par Dicer pour être ensuite incorporé au complexe RISC. Dans ce but, un plasmide sera construit. Il comprendra le gène *ura4* antisens (796 pb) sous le contrôle d'un promoteur régulable à la tétracycline, le gène *LEU2* (gène codant une enzyme impliquée dans la biosynthèse de la leucine), le gène *ARS1* (origine de répllication de *S. pombe*) et *amp<sup>R</sup>* (gène codant *bla*). De ce fait, il pourra se répliquer dans la levure *S. pombe* et y sera sélectionnable.

La deuxième méthode consiste à produire une petite "hairpin" d'ARN de 25 paires de bases. Le vecteur utilisé comprend un promoteur régulable à la tétracycline, le gène *LEU2*, le gène *ARS1* et *amp<sup>R</sup>*. L'ADN insert de 57 paires de bases, cloné sous le contrôle du promoteur Tet, consiste en deux séquences inversement répétées de 25 paires de bases de *ura4* séparées par 7 paires de bases (linker). De la sorte, le transcrit produit se conforme en une "hairpin" de 25 paires de bases avec une boucle de 7 nucléotides.

La troisième méthode, similaire en tout points à la précédente, consiste cette fois à produire une "hairpin" d'ARN de 350 paires de bases. On utilisera le même vecteur pour y cloner un insert de 770 paires de bases codant une "hairpin" de 350 paires de bases et un linker de 70 nucléotides.

Enfin, la dernière méthode consiste en un essai d'introduction directe de siRNA dans la levure *S. pombe*.

## Résultats

Nous avons décidé, sur base de résultats parus dans la littérature, de construire plusieurs vecteurs contenant soit la séquence du gène *ura4* entier soit seulement une partie, sous le contrôle d'un promoteur régulable à la tétracycline. Divers arrangements susceptibles de conduire à la production d'ARN double-brin pour tenter d'induire le système RNAi chez la levure *S. pombe* contre l'ARNm du gène en question seront testés. Un vecteur contiendra le gène *ura4* antisens complet (796 nucléotides) (Raponi *et al.*, 2003). Un second vecteur comprendra une séquence de 57 nucléotides codant pour une partie du gène *ura4* et qui produira une petite "hairpin" d'ARN de 25 paires de bases (Brummelkamp *et al.*, 2002). Enfin, un dernier vecteur contiendra une séquence de 770 nucléotides codant également pour une partie du gène *ura4* et qui produira une "hairpin" d'ARN de 350 paires de bases (Schramke *et al.*, 2003).

En parallèle, nous nous proposons aussi de court-circuiter la procédure d'induction basée sur la synthèse de dsRNA dans la cellule en transformant directement celle-ci par des siRNA de synthèse.

Nous allons donc introduire les vecteurs construits ou les siRNA synthétiques dans une souche de levure (*ura*<sup>+</sup>) afin de cibler la dégradation de l'ARNm du gène *ura4* présent dans la levure par RNAi silencing.

### 1. Le système tétracycline

Dans le cadre de ce travail, nous avons décidé d'utiliser un système d'expression régulable afin d'induire le système RNAi chez *S. pombe*. Nous avons choisi le système inductible à la tétracycline (Tet).

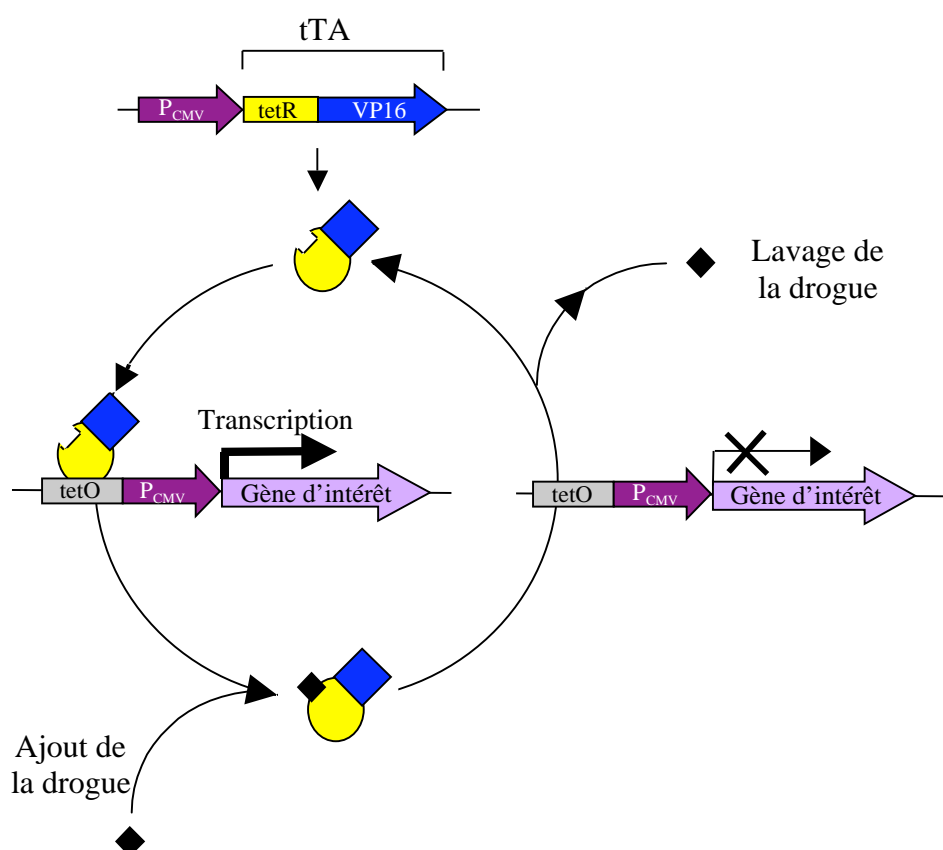
#### 1.1 La tétracycline

La tétracycline est une drogue "antibiotique" qui inhibe la synthèse protéique en se fixant à la sous-unité 30 S des ribosomes de *E. coli* et des bactéries en général et empêche l'attachement des amino-acyl-RNA au site A du ribosome. Cette drogue reconnaît la petite sous-unité du ribosome procaryote mais n'a aucun effet sur le ribosome eucaryote.

#### 1.2 Les promoteurs régulables

Le promoteur régulable que nous allons utiliser est issu du transposon Tn10 d'*E. coli*, codant la résistance à la tétracycline. Ce transposon contient quatre gènes: TetA, C, D et R. TetA est responsable de la résistance à la tétracycline. Tet R est un répresseur qui se lie à des séquences se trouvant dans le promoteur (séquences tetO). Lorsqu'il n'y a pas de tétracycline, TetR se lie aux régions tetO et inhibe la transcription de TetA, D et R. Par contre, quand la drogue est présente, l'interaction de celle-ci avec TetR induit un changement de conformation et TetR ne peut alors plus se fixer sur tetO. Cela rend alors le promoteur accessible à la polymérase. TetA est transcrit, rendant la bactérie résistante à l'antibiotique (Braus *et al.*, 1984).

Manfred Gossen et son équipe ont développé un système d'expression régulable par la tétracycline chez les cellules de mammifères. Ils ont construit un activateur de la transcription hybride en combinant TetR, qui se lie aux régions de l'ADN tetO, et le domaine C-terminal de VP16 (HSV)<sup>3</sup>, qui recrute la RNA polymérase II eucaryote. Ce transactivateur hybride, appelé tTA (tetracycline Transactivator), se lie aux séquences tetO en absence de tétracycline, permettant l'expression de gènes sous contrôle d'un promoteur contenant ces boîtes. Lorsqu'on ajoute la drogue, TetR change de conformation et se détache des boîtes tetO. L'expression est alors inhibée (figure 1) (Faryar *et al.*, 1992).

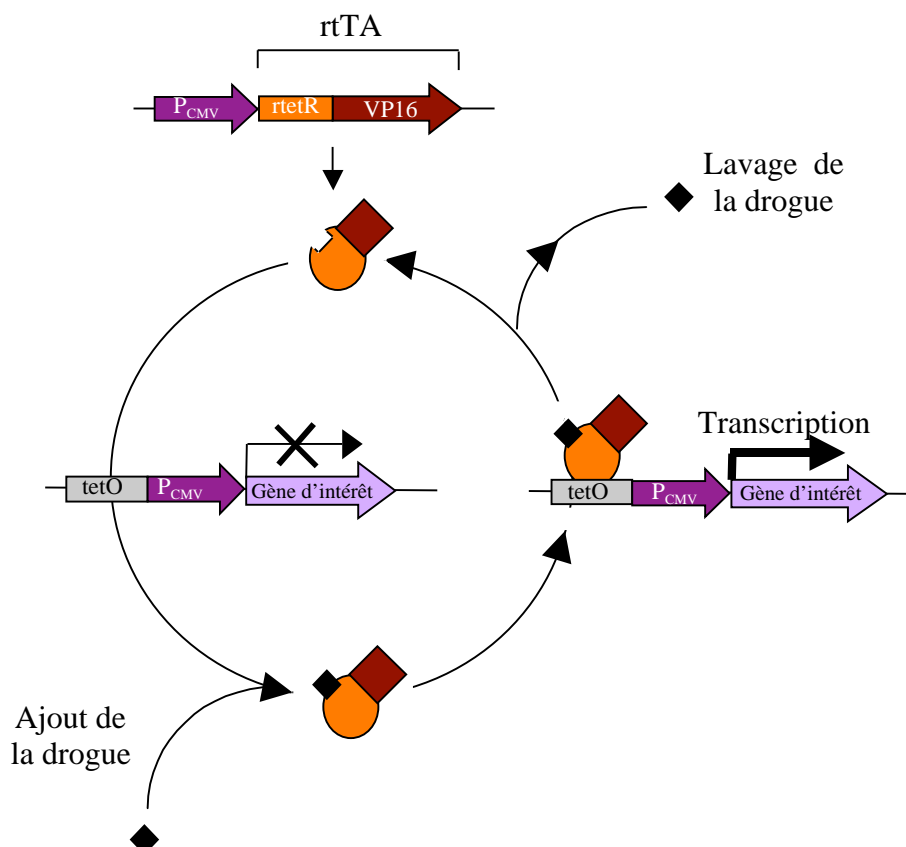


**Figure 1 :** Promoteur régulable à la tétracycline. Le facteur de transcription tTA est composé de deux domaines. Le premier est un domaine de liaison à l'ADN, nommé tetR, qui reconnaît la boîte tetO (Faryar *et al.*, 1992). Le deuxième est un domaine transactivateur VP16 qui recrute la machinerie de transcription PolII. En absence de la drogue, tetR reconnaît tetO et la transcription du gène est induite. En présence de la drogue, tetR ne se lie plus à tetO et il n'y a pas d'expression.

Trois ans plus tard, le même groupe a développé le système inverse. Par mutation aléatoire de TetR, ils isolent un allèle qui, si et seulement si il lie la tétracycline, est capable de reconnaître les boîtes tetO. Ils ont appelé leur transactivateur hybride rtTA pour "reverse tetracycline transactivator" (figure 2) (Gossen *et al.*, 1995).

<sup>3</sup> HSV!: Herpes Simplex Virus. VP16 est un activateur transcriptionnel codé par le virus.





**Figure 2 :** Promoteur hybride régulable à la tétracycline. Le facteur de transcription rtTA correspond à tTA dont quatre acides aminés ont été mutés. Ces mutations induisent un changement conformationnel du facteur qui l'empêche de se lier à tetO en absence de drogue. En présence de la drogue, rTetR reconnaît tetO et la transcription est induite.

Ces deux systèmes ont été utilisés chez la levure *S. cerevisiae* (Gari *et al.*, 1997!; Belli *et al.*, 1998) et toute une série de plasmides adaptés à cette levure ont été construits (les pCM). Non seulement les vecteurs contiennent un promoteur contenant des boîtes tetO (tetO-CYC1), mais en plus, ils expriment tTA ou rtTA sous le contrôle d'un promoteur constitutif fort (figure 1 et 2).

L'induction peut également être réalisée avec la doxycycline, un analogue de la tétracycline (appartenant à la même famille) qui agit de la même manière.

Nous nous sommes basés sur les plasmides développés chez *S. cerevisiae* pour adapter le système à *S. pombe* (Belli *et al.*, 1998).

## 2. Construction des outils

### 2.1 *Ura4 antisens complet (pAUS2)*

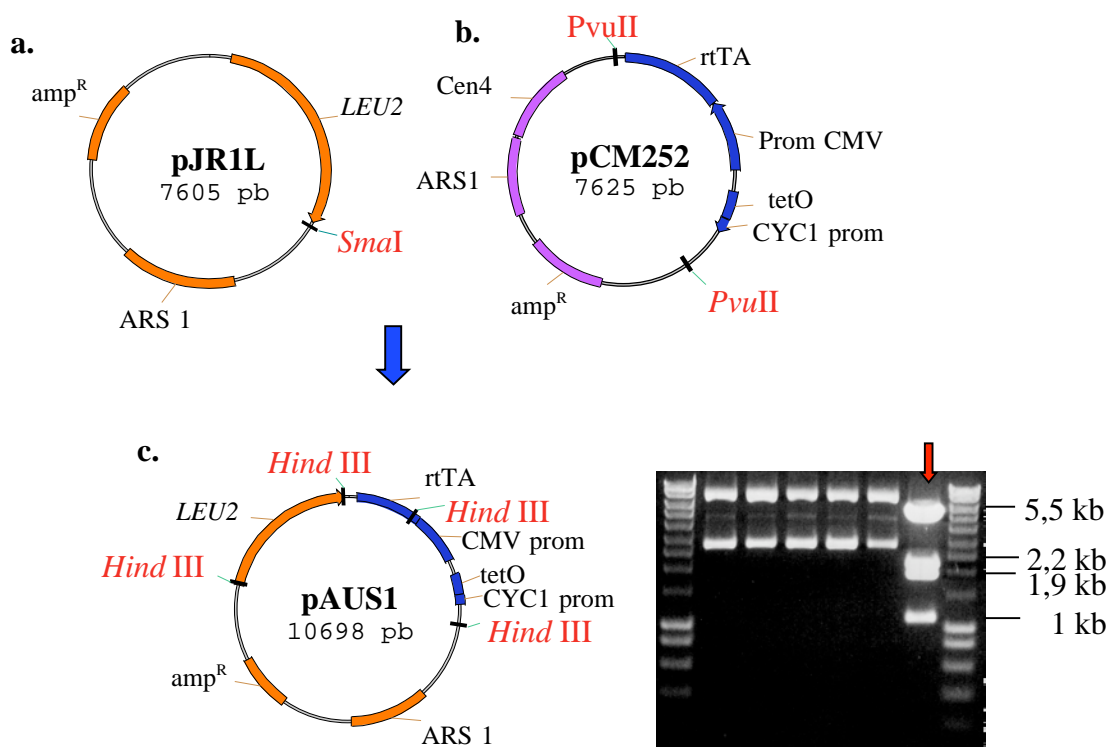
Cette première construction, pAUS2, contiendra en finale le gène *ura4* antisens (796 pb) sous le contrôle d'un promoteur régulable à la tétracycline, *LEU2* codant une enzyme impliquée dans la biosynthèse de la leucine, *ARS1* constituant une origine de réplication de *S. pombe* et *amp<sup>R</sup>* codant la  $\beta$ -lactamase et conférant la résistance à l'ampicilline. C'est donc un plasmide réplcatif et sélectionnable chez *S. pombe*. Afin d'obtenir ce plasmide, deux constructions intermédiaires, pAUS1 et pAUS4, sont nécessaires (voir points suivants). Une fois pAUS2 construit, nous transformerons *S. pombe* avec ce plasmide afin d'induire le système RNAi et d'éteindre l'expression du gène *ura4*.

#### 2.1.1 Construction du pAUS1

Nous avons obtenu le pAUS1 (figure 3c), contenant *LEU2*, *ARS1* et la cassette contenant le promoteur régulable à la tétracycline comme décrit ci-après. Le plasmide pJR1L (figure 3a), un vecteur d'expression chez *S. pombe*, a été tout d'abord restreint pour y cloner une séquence contenant le promoteur Tet, provenant du pCM252 (figure 3b). Pour cette construction, des enzymes à bouts francs ont été utilisées, ce qui nécessite une déphosphorylation préalable de la matrice (à la Shrimp Alkaline Phosphatase). Cette étape de déphosphorylation diminue le risque que la matrice se referme sur elle-même.

Une fois les plasmides restreints et déphosphorylés, les bandes adéquates sont récupérées et purifiées grâce au kit "MBI fermentas" après passage sur gel d'agarose du produit de restriction. Ensuite, les deux fragments sont "ligués" par l'action de la T4 DNA ligase.

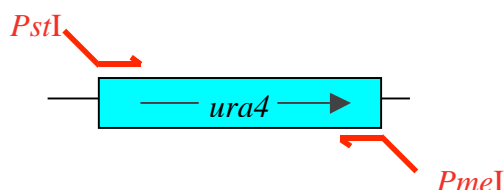
Nous avons transformé le produit de "ligation" dans la souche DH10B d'*E. coli*. Ensuite, nous avons réalisé des restrictions diagnostiques sur des minipréparations d'ADN de clones issus de la transformation afin de vérifier la construction (figure 3c). pAUS1 va nous servir de plasmide matrice dans lequel le gène *ura4* antisens et une séquence de 57 nucléotides codant une petite "hairpin" seront clonés séparément (pAUS2 et pAUS3, respectivement).



**Figure 3!:** Les étapes de construction du plasmide pAUS1. **a)** Plasmide de base pJR1L. Ce plasmide est restreint et linéarisé par l'enzyme *SmaI* et mis sur gel. **b)** Plasmide pCM252 contenant la cassette Tet. Ce plasmide est restreint en deux fragments (4,5 kb et 3,1 kb) par l'enzyme *PvuII* et mis sur gel. La bande à 3 kb est récupérée pour la "ligation". **c)** Plasmide pAUS1 et gel d'agarose illustrant des restrictions diagnostiques effectuées avec l'enzyme *HindIII* sur six clones issus de la transformation. Quatre bandes sont attendues! 5,5 kb; 2,2 kb; 1,9 kb et 1,1 kb. La flèche rouge indique un clone donnant le profil de restriction attendu. Les pistes extérieures correspondent à des marqueurs de taille.

### 2.1.2 Construction du pAUS4

Pour cette construction, nous avons utilisé le plasmide pGEM-t easy pour y cloner un fragment PCR correspondant au gène complet *ura4* (796 pb) de *S. pombe*. Il a été amplifié à partir d'une banque d'ADN génomique d'une souche *ura<sup>+</sup>* (SPQ01). Les amorces ont été choisies de telle sorte qu'elles permettent le clonage du fragment *ura* de manière antisens dans le plasmide pAUS1. Le site de restriction de l'enzyme *PstI* a donc été ajouté à l'amorce "forward" (25 nucléotides) et le site de l'enzyme *PmeI* à l'amorce "reverse" (25 nucléotides) (figure 4).

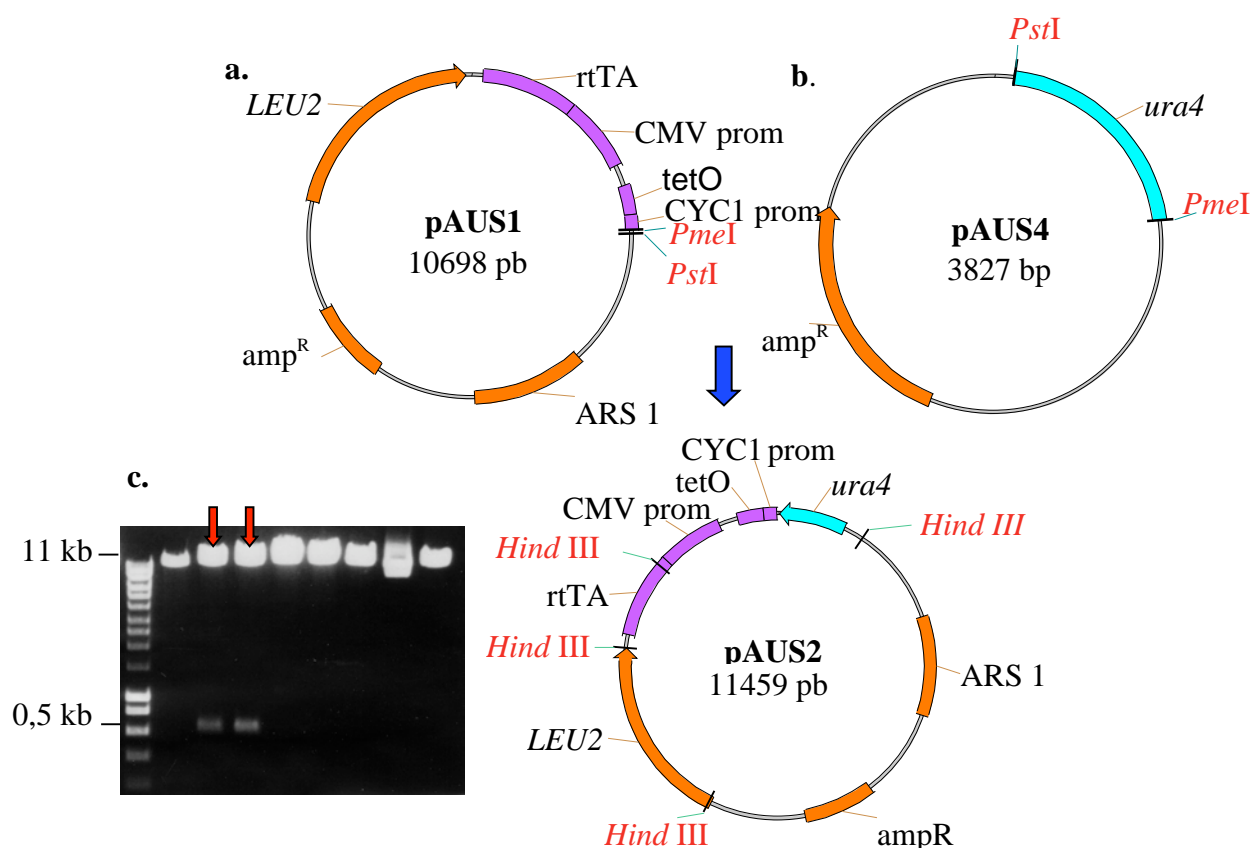


**Figure 4 :** Clonage de *ura4* dans le pGEM-t easy. Les flèches horizontales représentent les amorces correspondant aux extrémités 5' et 3' de la séquence *ura4* à amplifier et les prolongements obliques représentent les sites *PstI* et *PmeI* qui, respectivement, y ont été ajoutés.

### 2.1.3 Construction du pAUS2

pAUS2 (figure 5c) correspond à pAUS1 dans lequel nous avons cloné *ura4* en antisens. Nous avons restreint pAUS1 et pAUS4 avec les enzymes *Pst*I et *Pme*I, comme indiqué dans la figure 5a et 5b. Ensuite, nous avons "ligué" le fragment contenant le gène *ura4* (796 nucléotides) du plasmide pAUS4 avec le fragment de 10 kb du plasmide pAUS1.

Nous avons transformé le produit de "ligation" dans la souche DH10B d'*E. coli*. En finale, nous avons réalisé des restrictions diagnostiques sur des minipréparations d'ADN de clones issus de la transformation afin de vérifier la construction (figure 5c). pAUS2 sera par la suite introduit dans la levure *S. pombe* pour y induire le système RNAi et éteindre l'expression du gène *ura4*.



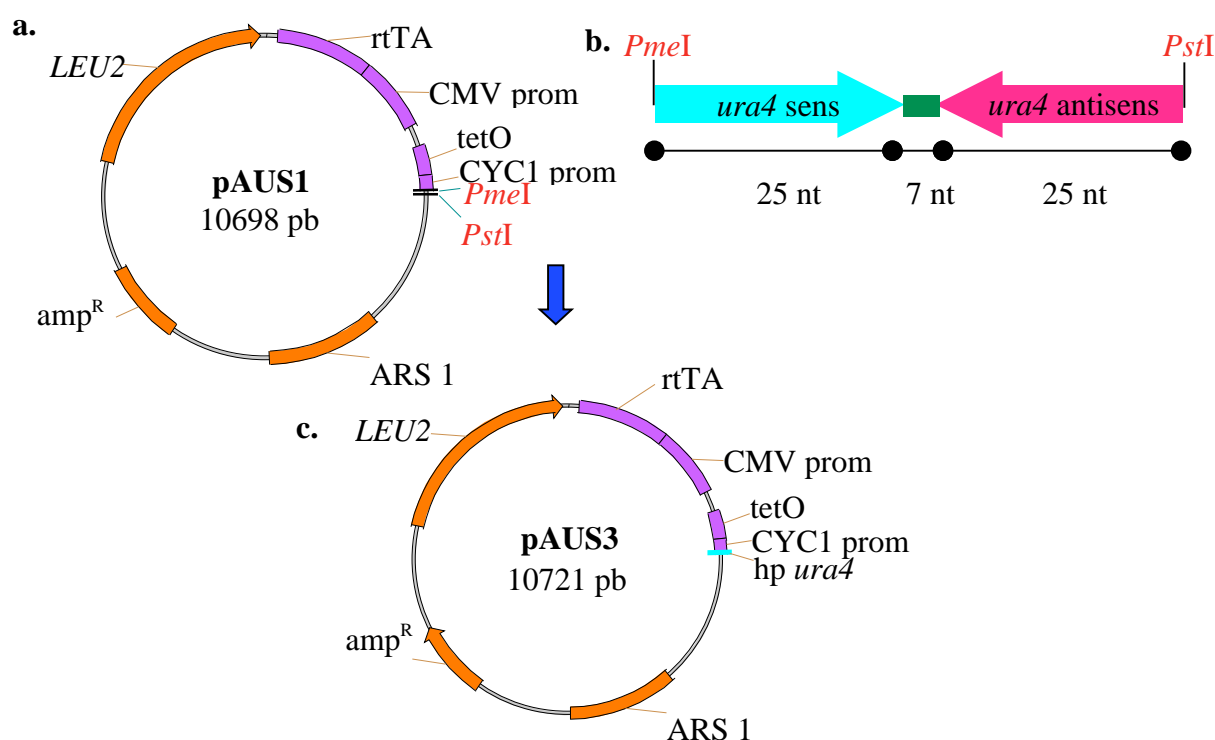
**Figure 5!:** Les étapes de construction du plasmide pAUS2. **a)** Plasmide de base pAUS1. Ce plasmide est restreint par les enzymes *Pme*I et *Pst*I. La bande à 10 kb est récupérée pour la "ligation". **b)** Plasmide pAUS4. pAUS4 est restreint en deux fragments par les enzymes *Pme*I et *Pst*I. La bande à 0,8 kb est récupérée pour la "ligation". **c)** Plasmide pAUS2 et gel d'agarose illustrant des restrictions diagnostiques effectuées avec l'enzyme *Hind*III sur sept clones issus de la transformation et mises sur gel. Deux bandes sont attendues!: 11 kb et 0,5 kb. Les flèches rouges indiquent des clones donnant le profil de restriction attendu. La première piste correspond à un marqueur de taille.

## 2.2 Petite hairpin *ura4* (pAUS3)

Cette construction, pAUS3 (figure 6c), contiendra en finale une séquence de 57 nucléotides du gène *ura4* qui code une petite "hairpin" d'ARN sous le contrôle d'un promoteur régulable à la tétracycline, le gène *LEU2*, le gène *ARS1* et *amp<sup>R</sup>*. L'"hairpin" d'ARN se composera de 25 paires de bases d'ARN et d'un linker de 7 nucléotides. Une fois pAUS3 construit, il va être introduit dans la levure *S. pombe* afin d'induire le système RNAi et éteindre l'expression du gène *ura4*.

Pratiquement, nous avons restreint le plasmide pAUS1 par les enzymes *PmeI* et *PstI*. Deux oligonucléotides ont été hybridés comme présentés à la figure 6. Ils sont complémentaires, excepté leurs extrémités qui forment une extrémité protrudante compatible avec *PstI* et une extrémité à bouts francs (*PmeI* génère des bouts francs). Ensuite, nous avons "ligué" la bande à 10 kb obtenue avec ces oligonucléotides.

Nous avons transformé le produit de "ligation" dans la souche DH10B d'*E. coli*. En finale, des restrictions diagnostiques ont été réalisées sur des minipréparations d'ADN de clones issus de la transformation afin de vérifier la construction. Aucun clone ne montre le profil attendu.



**Figure 6!:** Principe de construction du plasmide pAUS3. **a)** Plasmide de base pAUS1. Ce plasmide est restreint par les enzymes *PmeI* et *PstI*. La bande à 10 kb est récupérée pour la "ligation". **b)** Séquence "hairpin" *ura4* (*hp ura4*) (c'est-à-dire destinée à produire la petite "hairpin" *ura4* comme expliqué dans le texte) avec le site *PmeI* en amont et *PstI* en aval. **c)** Plasmide pAUS3.

## 2.3 Grande hairpin *ura4*

La troisième construction, pAUS9, contiendra en finale une séquence de 770 nucléotides du gène *ura4* codant une "hairpin" d'ARN sous le contrôle d'un promoteur régulable à la tétracycline, le gène *LEU2*, le gène *ARS1* et *amp<sup>R</sup>*. De ce fait, il pourra se répliquer dans la levure *S. pombe* et y sera sélectionnable. L'"hairpin" d'ARN se composera de 350 paires de bases d'ARN et d'un linker de 70 nucléotides.

Afin d'obtenir ce plasmide, plusieurs constructions intermédiaires (pAUS5, pAUS6, pAUS7 et pAUS8) sont nécessaires. La construction de pAUS9 nécessite également l'utilisation du système "Multisite Gateway<sup>TM</sup>" pour sa réalisation. Une fois pAUS9 construit, il va être introduit dans la levure *S. pombe* afin d'induire le système RNAi et d'éteindre l'expression du gène *ura4*.

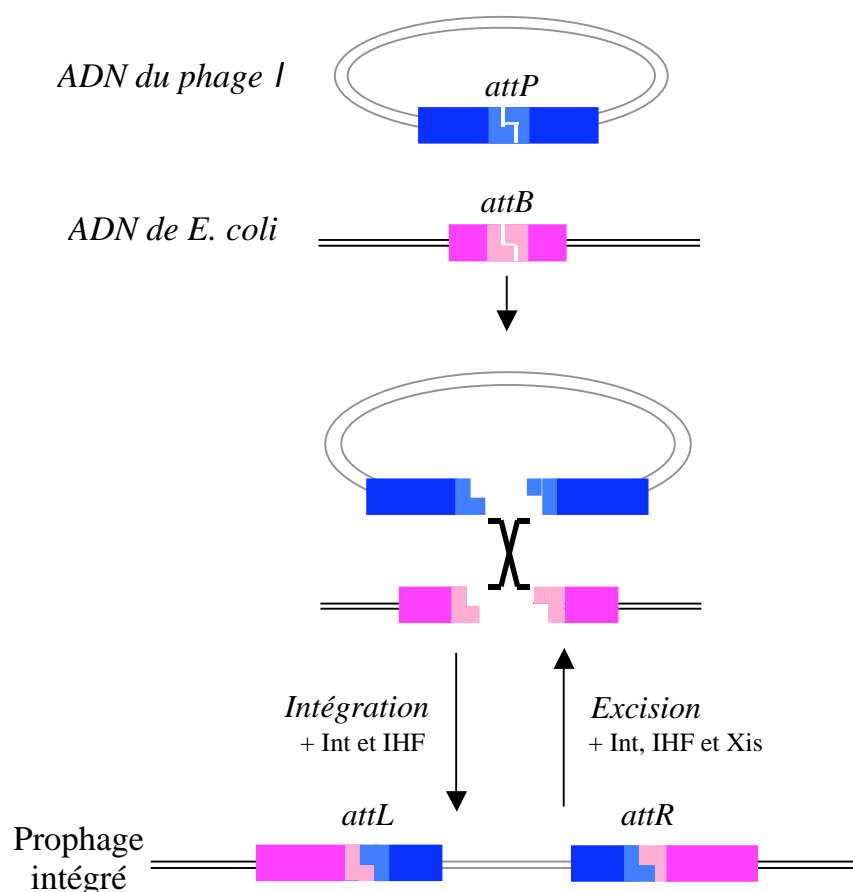
### 2.3.1 Le système "Gateway<sup>TM</sup>" et "Multisite Gateway<sup>TM</sup>"

#### Principe

Le principe général du système Gateway<sup>TM</sup> est calqué sur les réactions de recombinaison que le phage  $\lambda$  utilise pour intégrer son génome dans celui d'*E. coli*, ou l'exciser.

L'intégration du génome se fait grâce à la présence du site attP sur l'ADN du phage et du site attB dans le génome de la bactérie. Le résultat de la recombinaison entre ces deux sites, appelée "réaction BP", donne un site attL d'un côté du génome phagien intégré et un site attR de l'autre côté. Cette réaction requiert deux enzymes: l'intégrase du phage (Int) et la protéine d'intégration du facteur hôte de la bactérie (IHF). Ces deux activités enzymatiques sont désignées ensemble sous le nom de "BP clonase". Cette réaction BP est réversible et l'excision du génome phagien, aussi appelée "réaction LR", s'effectue par une recombinaison entre le site attL et le site attR. Elle requiert Int et IHF mais également une autre enzyme phagienne, l'excisionase (Xis). Ces trois enzymes sont désignées sous le nom de "LR clonase" (figure 7) (Walhout *et al.*, 2000).

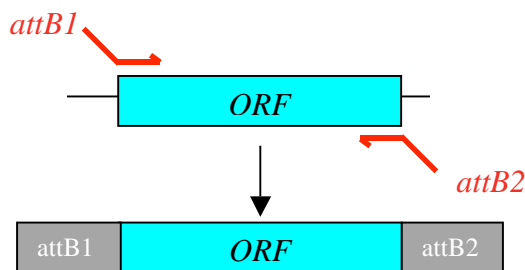
Le système Gateway<sup>TM</sup> est utilisé pour cloner aisément et efficacement des ORFs dans des "vecteurs donneurs" nommés alors "clones d'entrée".



**Figure 7!:** Mécanisme schématique de l'intégration et de l'excision du phage  $\lambda$ .

### En pratique

L'ORF (Open Reading Frame) d'intérêt est amplifiée par PCR en utilisant des amorces spécifiques de cette ORF. L'amorce "forward" doit contenir la séquence du site *attB1* à son extrémité flottante et l'amorce "reverse", quant à elle, la séquence du site *attB2* (figure 8). Une fois le produit PCR obtenu, une recombinaison (réaction BP) entre les sites *attB1* et *attB2* de celui-ci et les sites *attP1* et *attP2* du vecteur donneur est réalisée, donnant naissance au "clone d'entrée". Une réaction LR entre ce clone d'entrée et le "vecteur de destination" génère le "clone d'expression". Dans le cadre d'une fusion traductionnelle utilisant le système "Multisite Gateway™", il est nécessaire de tenir compte de la phase nucléotidique afin d'obtenir des protéines adéquates.



**Figure 8!:** Amplification de l'ORF par PCR. Les flèches horizontales représentent les amorces correspondant aux extrémités 5' et 3' de l'ORF à amplifier et les prolongements obliques représentent les sites *attB1* et *attB2* qui, respectivement, y ont été ajoutés.

Les vecteurs donneur et de destination contiennent un marqueur de résistance au chloramphénicol et un gène toxique *ccdB* flanqués des sites attP pour le vecteur donneur et des sites attL pour le vecteur de destination. La protéine issue du gène *ccdB* est toxique car elle interfère avec la DNA gyrase. S'il y a eu recombinaison, le gène *ccdB* est excisé du vecteur donneur et remplacé par le produit PCR. S'il n'y a pas eu recombinaison, le gène *ccdB* est toujours présent dans le vecteur donneur et les bactéries qui le porteront mourront. Ce gène permet donc une sélection positive des transformants désirés. Notons qu'il existe une souche d'*E. coli*, DB3.1, qui porte une mutation dans la gyrase, ce qui lui confère une résistance à *ccdB* et autorise donc la manipulation *in vivo* des vecteurs qui le portent.

Pour permettre l'intégration du produit PCR dans le vecteur d'entrée, plusieurs sites attB, attP, attL et attR sont nécessaires. Les sites att ont donc été mutés pour générer des paires de sites dérivés de chacun. Le site attB a été modifié en sites attB1 et attB2, attP en attP1 et attP2, attL en attL1 et attL2 et enfin, attR en attR1 et attR2, etc. Néanmoins, la recombinaison n'est possible qu'entre attB1 et attP1, attB2 et attP2, attL1 et attR1, etc. (Walhout *et al.*, 2000). Ces derniers peuvent à leur tour être modifiés pour permettre le clonage multiple d'ORFs par le système "Multisite Gateway<sup>TM</sup>".

Le système "Multisite Gateway<sup>TM</sup>" se base sur le même principe que le système Gateway<sup>TM</sup> mais est utilisé pour mettre plusieurs ORF à la suite grâce à une recombinaison entre plusieurs clones d'entrée et un vecteur de destination.

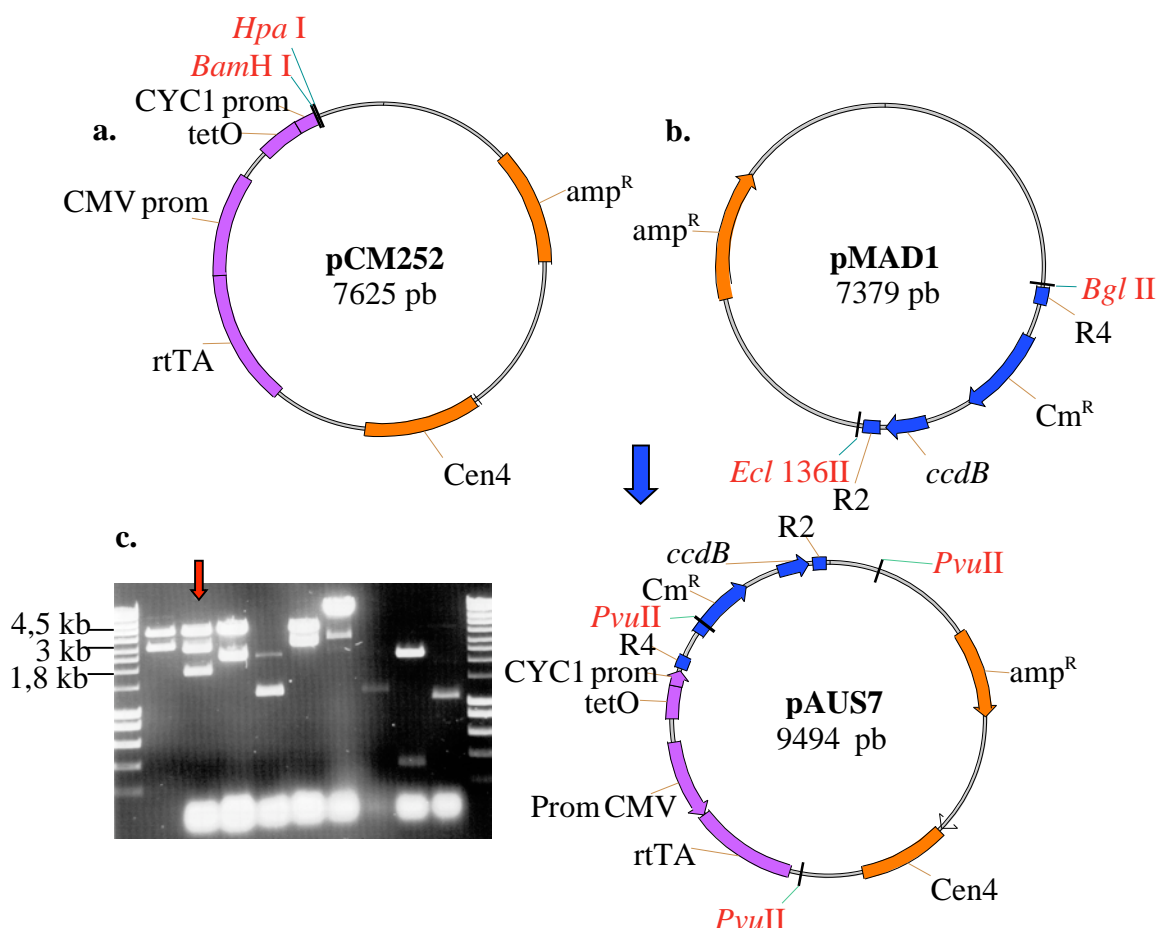
### 2.3.2 Construction du vecteur pAUS7

pAUS7 (figure 9c) contient un promoteur régulable à la tétracycline, amp<sup>R</sup>, CEN4 (origine de répllication de *S. cerevisiae*) venant du plasmide pCM252 (figure 9a) ainsi qu'une cassette Gateway<sup>TM</sup> R4R2 issue du plasmide pMAD1 (figure 9b).

Pour obtenir cette construction, nous avons restreint le plasmide pMAD1 par les enzymes *Ecl*136II et *Bgl*II et le plasmide pCM252 par les enzymes *Hpa*I et *Bam*HI. Ensuite, nous avons "ligué" la bande à 2 kb provenant de pMAD1 avec la bande à 7,5 kb du plasmide pCM252.

Nous avons transformé le produit de "ligation" dans la souche DB3.1 d'*E. coli*. En finale, des restrictions diagnostiques ont été réalisées sur des minipréparations d'ADN (figure 9c) de clones issus de la transformation afin de vérifier la construction.





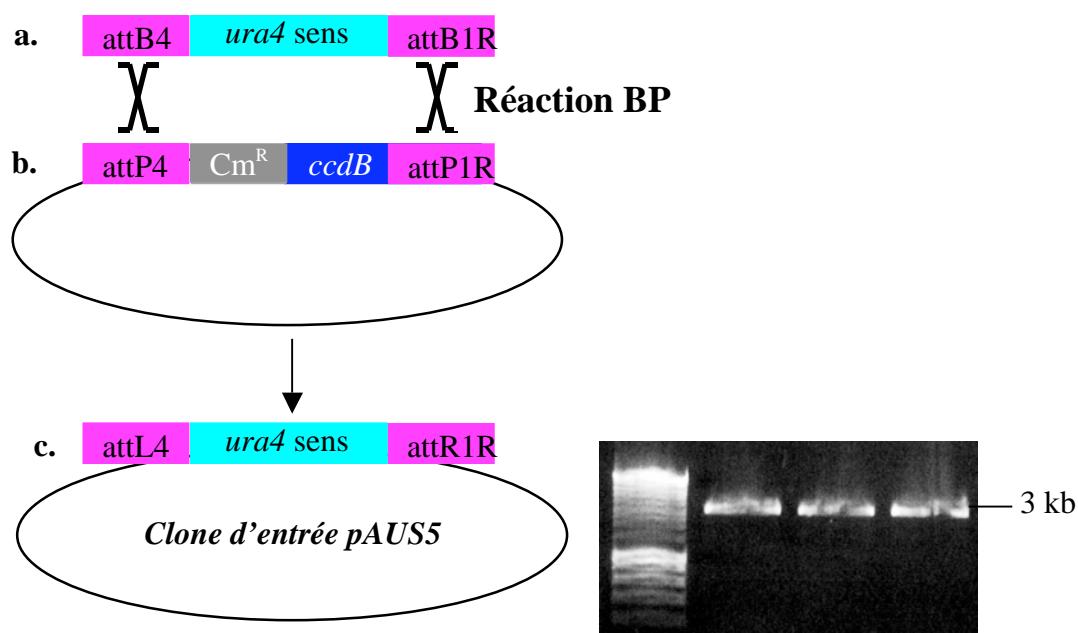
**Figure 9!:** Principe de construction du plasmide pAUS7. **a)** Plasmide de base pCM252. Ce plasmide est restreint par les enzymes *HpaI* et *BamHI*. La bande à 7,5 kb est récupérée pour la "ligation". **b)** Plasmide pMAD1 qui contient la cassette Gateway™ R4R2 (en bleu). Ce plasmide est restreint en deux fragments par les enzymes *Ecl136II* et *BglII* et mis sur gel. La bande à 2 kb est récupérée pour la "ligation". **c)** Plasmide pAUS7 et gel d'agarose illustrant des restrictions diagnostiques effectuées avec l'enzyme *PvuII* sur huit clones issus de la transformation et mises sur gel. Trois bandes sont attendues! : 4,5 kb; 3,1 kb et 1,9 kb. La flèche rouge indique un clone donnant le profil de restriction attendu. Les pistes extérieures correspondent à un marqueur de taille.

### 2.3.3 Construction du clone d'entrée pAUS5

pAUS5 (figure 10c) est un clone d'entrée contenant 350 nucléotides du gène *ura4* et servira à la réaction LR avec le vecteur de destination.

Dans ce but, les 350 nucléotides du gène *ura4* ont été amplifiés à partir de l'ADNg de la souche SPQ01 de *S. pombe* grâce à deux primers contenant des sites attB (figure 10a). L'amorce "forward" contient le site attB4 à son extrémité 5' et l'amorce "reverse" contient le site attB1R à cette même extrémité. Le vecteur d'entrée pDNR P4P1R (figure 10b) contient les cassettes attP4 et attP1R permettant la réalisation de la réaction BP entre le produit PCR et ce plasmide. Il contient également le gène toxique *ccdB* et un gène de résistance au chloramphénicol (Cm<sup>R</sup>) au milieu de ces cassettes.

Finalement, nous avons transformé le produit de la réaction dans la souche DH10B d'*E. coli*. Nous avons réalisé des restrictions diagnostiques sur des minipréparations d'ADN de clones issus de la transformation afin de vérifier la construction (figure 10c).

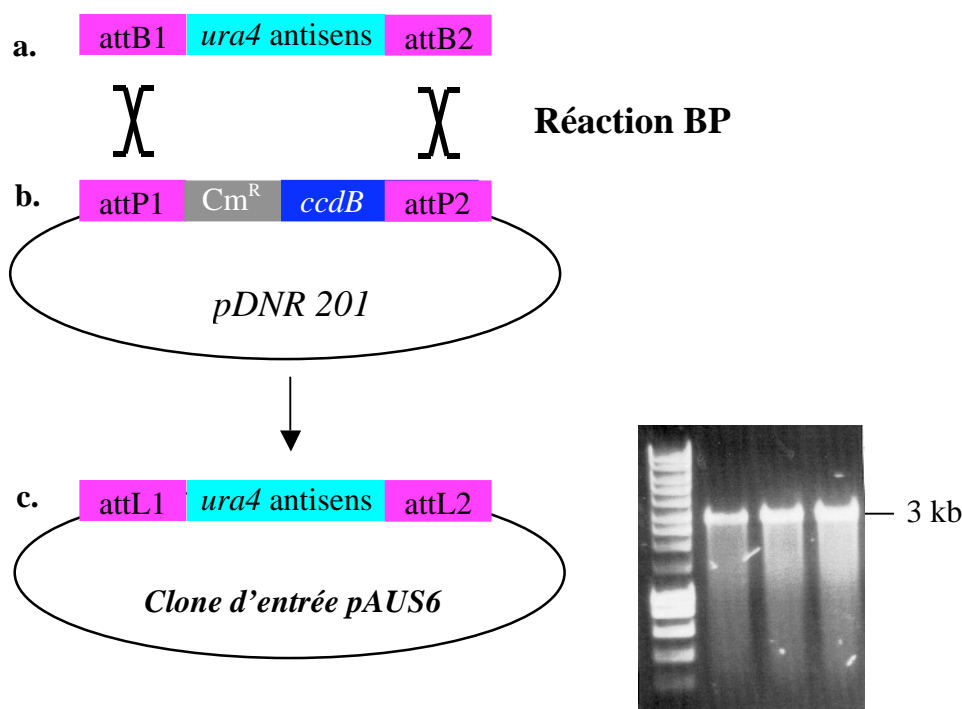


**Figure 10!**: Les étapes de construction du plasmide pAUS5. **a)** Le produit PCR des 350 nucléotides du gène *ura4* amplifiés grâce à deux amorces contenant des sites attB. **b)** Plasmide d'entrée pDNR P4P1R. **c)** Clone d'entrée pAUS5 et gel d'agarose illustrant des restrictions diagnostiques effectuées avec l'enzyme *PvuII* sur trois clones issus de la transformation et mises sur gel. Une bande est attendue à 3 kb. La première piste correspond à un marqueur de taille.

### 2.3.4 Construction du clone d'entrée pAUS6

pAUS6 (figure 11c) est un clone d'entrée contenant 350 nucléotides du gène *ura4* et servira également à la réaction LR avec le vecteur de destination. Dans ce but, les 350 nucléotides du gène *ura4* ont été amplifiés à partir de l'ADNg de la souche SPQ01 de *S. pombe* grâce à deux primers contenant des sites attB (figure 11a). L'amorce "forward" contient le site attB2 à son extrémité 5' et l'amorce "reverse" contient le site attB1 à cette même extrémité. Le vecteur d'entrée pDNR P201 (figure 11b) contient les cassettes attB1 et attB2 permettant la réalisation de la réaction BP entre le produit PCR et ce plasmide. Il contient également le gène toxique *ccdB* et  $Cm^R$  au milieu de ces cassettes.

Finalement, nous avons transformé le produit de la réaction dans la souche DH10B d'*E. coli*. Nous avons réalisé des restrictions diagnostiques sur des minipréparations d'ADN de clones issus de la transformation afin de vérifier la construction (figure 11c).

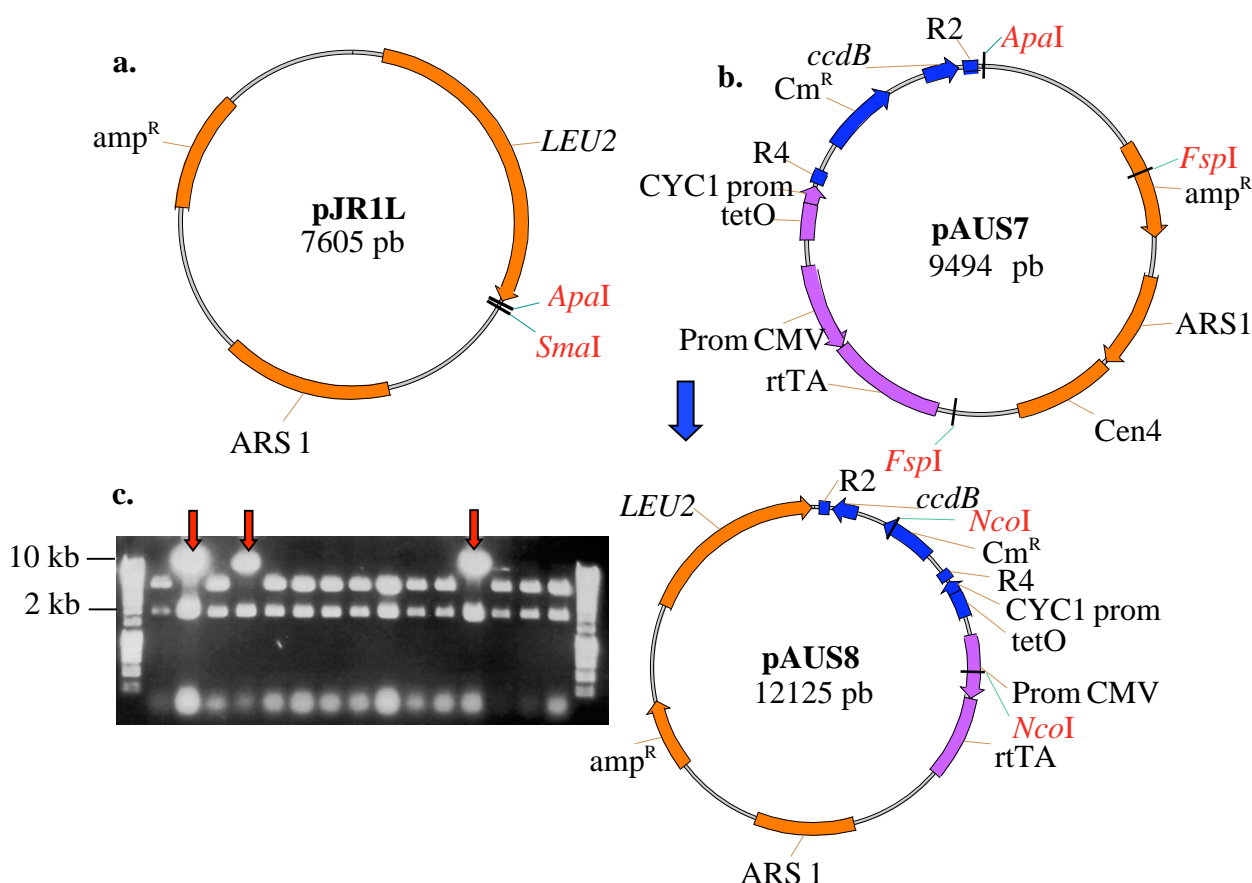


**Figure 11!:** Principe de construction du plasmide pAUS6. **a)** Le produit PCR des 350 nucléotides du gène *ura4* amplifiés grâce à deux amorces contenant des sites attB. **b)** Plasmide d'entrée pDNR P201. **c)** Clone d'entrée pAUS6 et gel d'agarose illustrant des restrictions diagnostiques effectuées avec l'enzyme *PvuII* sur trois clones issus de la transformation et mises sur gel. Une bande est attendue à 3 kb. La première piste correspond à un marqueur de taille.

### 2.3.5 Construction du vecteur de destination pAUS8

pAUS8 (figure 12c) contient le gène *LEU2*,  $amp^R$  et *ARS1* venant du pJR1L (figure 12a), ainsi que la cassette R4R2 et le promoteur régulable à la tétracycline issus du pAUS7 (figure 12b). Dans ce but, nous avons restreint pAUS7 par les enzymes *ApaI* et *FspI* et pJR1L par les enzymes *ApaI* et *SmaI*. Ensuite, nous avons "ligué" la bande à 5 kb du pAUS7 avec la bande à 7,5 kb du pJR1L.

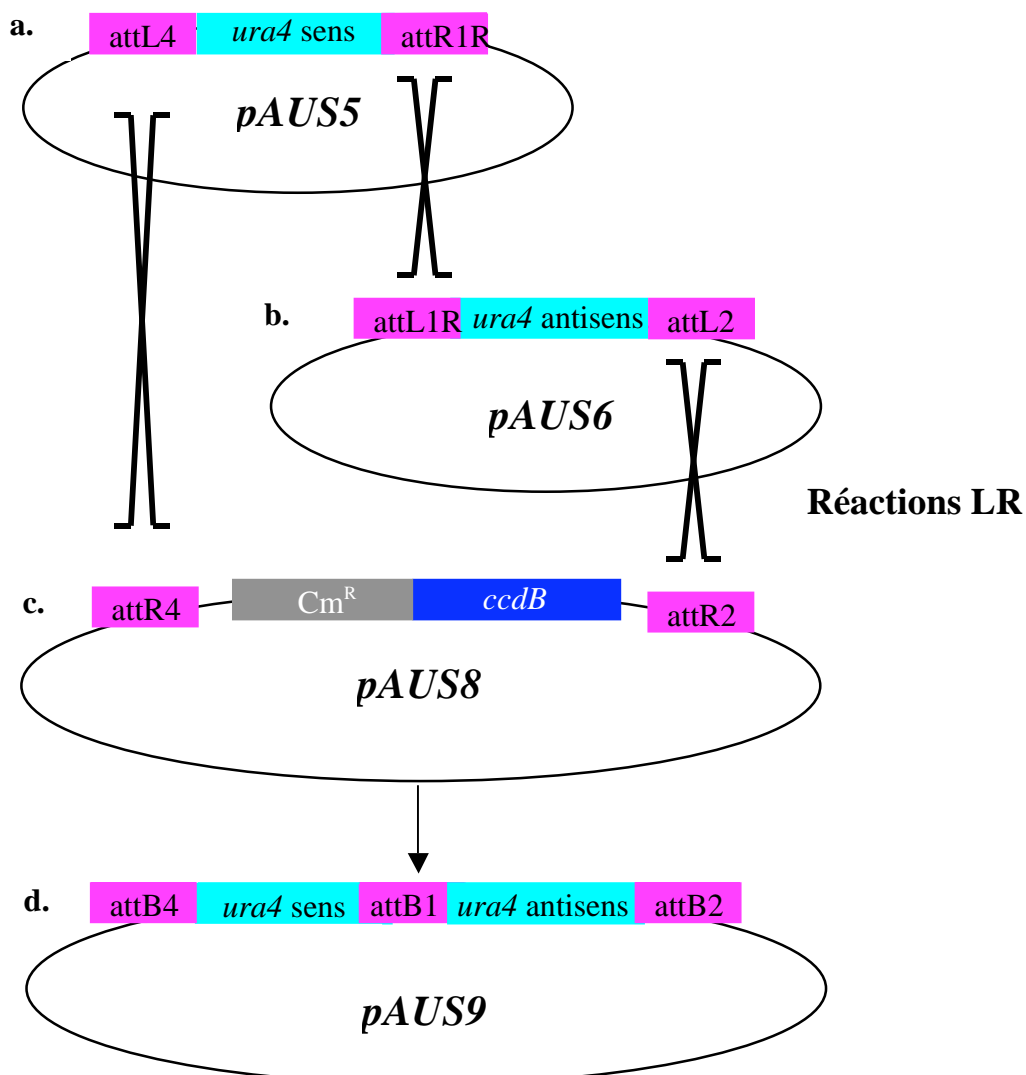
Par après, nous avons transformé le produit de "ligation" dans la souche DB3.1 d'*E. coli*. En finale, nous avons réalisé des restrictions diagnostiques sur des minipréparations d'ADN (figure 12c) de clones issus de la transformation afin de vérifier la construction.



**Figure 12!:** Principe de construction du plasmide pAUS8. **a)** Plasmide de base pJR1L. Ce plasmide est restreint par les enzymes *ApaI* et *SmaI*. La bande à 7,5 kb est récupérée pour la "ligation". **b)** Plasmide pAUS7 qui contient la cassette Gateway™ R4R2 (en bleu) et le promoteur régulable à la tétracycline (en mauve). Ce plasmide est restreint en trois fragments par les enzymes *ApaI* et *FspI* et mis sur gel. La bande à 5 kb est récupérée pour la "ligation". **c)** Plasmide pAUS8 et gel d'agarose illustrant des restrictions diagnostiques effectuées avec l'enzyme *NcoI* sur quinze clones issus de la transformation et mises sur gel. Deux bandes sont attendues!: 10 kb et 2 kb. Les flèches rouge indiquent des clones donnant le profil de restriction attendu. La première piste correspond à un marqueur de taille.

### 2.3.6 Construction du clone d'expression pAUS9

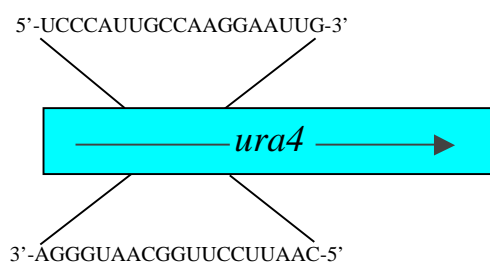
Le clone d'expression pAUS9 (figure 13d) contient une séquence codant une "hairpin" d'ARN de 350 paires de bases du gène *ura4* sous le contrôle du promoteur régulable à la tétracycline, *amp<sup>R</sup>*, le gène *LEU2* et *ARS1*. Il est obtenu en réalisant une réaction LR entre les clones d'entrée pAUS5 (cf. §1.3.4) (figure 13a), pAUS6 (cf. §1.3.5) (figure 13b) et le vecteur de destination pAUS8 (cf. §1.3.6) (figure 13c). Les sites L4 et R4 recombinent ensemble, ainsi que les sites R1R et L1 et les sites L2 et R2. Cette réaction LR est une réaction du système Multisite Gateway™, plusieurs fragments recombinent donc d'un coup.



**Figure 13!** Les étapes de construction du plasmide pAUS9. **a)** Clone d'entrée pAUS5. **b)** Clone d'entrée pAUS6. **c)** Clone de destination pAUS8. **d)** Clone d'expression pAUS9 contenant une séquence de 770 nucléotides codant une "hairpin" d'ARN de 350 paires de bases.

## 2.4 siRNA synthétiques

La quatrième manière choisie pour induire le système RNAi est l'introduction directe de siRNA. Ces siRNA ont été commandés à la firme Eurogentec (figure 14).



**Figure 14 :** Séquence du siRNA synthétique et localisation schématique sur le gène *ura4*. La séquence du siRNA commence à partir du 52<sup>ème</sup> nucléotide partant de l'extrémité 5' amont.

### 3. Test du silençage de l'ARNm *ura4*

Après avoir réalisé les constructions comme détaillé précédemment, les plasmides obtenus ont été transformés dans la souche SPQ01 (*ura*<sup>+</sup>) de *S. pombe* (cf. §3.1). En parallèle, nous avons aussi administré directement des siRNA de synthèse (cf. §3.2).

#### 3.1 Essais d'extinction de l'ARNm d'*ura4* par transformation des vecteurs dans *S. pombe*

Les vecteurs pAUS2, comprenant le gène *ura4* antisens, et pAUS9, comprenant une séquence de 770 nucléotides codant une "hairpin" de 350 paires de bases, ont été transformés dans la levure *S. pombe*. Nous avons repris trois candidats pour chaque transformation. Ils ont été testés sur différents milieux: sans drogue et avec drogue (tétracycline ou doxycycline). Cette drogue active la transcription des séquences en aval du promoteur tetO-CYC1 (figure 2), c'est-à-dire: *ura4* antisens pour le pAUS2 ou la grande "hairpin" pour le pAUS9. Le système RNAi devrait être alors induit et il devrait y avoir silençage du gène *ura4*.

Deux contrôles ont également été testés sur ces milieux. Le premier est la souche 23 (*ura*<sup>-</sup>) contenant le plasmide pJR1L, qui la rend prototrophe pour la leucine. Cette souche est *ura*<sup>-</sup> et mime donc un effet positif de la dégradation de l'ARNm d'*ura4* par les siRNA. La deuxième est la souche SPQ01 (*ura*<sup>+</sup>) contient le plasmide pAUS1, vecteur vide de toute construction productive de RNAi pour le gène *ura4* mais qui confère également la prototrophie pour la leucine. Cette souche représente un contrôle négatif de silençage.

Après avoir lancé une culture de chaque souche, nous avons réalisé différentes dilutions que nous avons disposées sous forme de gouttes sur les différents milieux.

##### 3.1.1 Observations des résultats

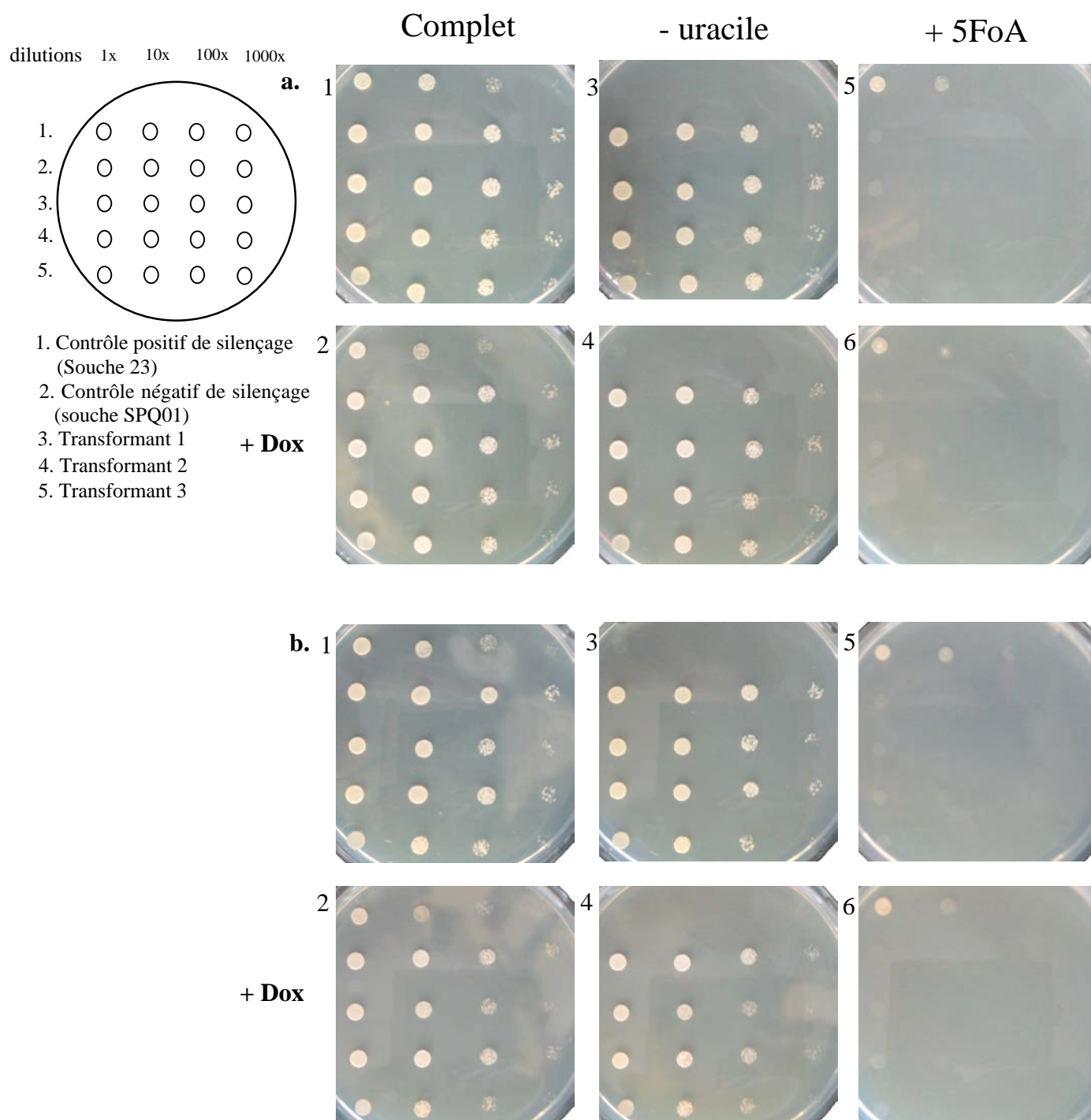
Le premier milieu testé est un milieu sélectif complet contenant notamment de l'uracile. Il constitue un contrôle positif de croissance. En effet, même si le système RNAi est induit (en présence de tétracycline ou de doxycycline) et qu'il y a dégradation de l'ARNm du gène *ura4*, l'uracile est présent dans le milieu et les cellules peuvent pousser. L'observation des boîtes illustre bien ces résultats. En effet, tous les candidats poussent et la taille des colonies présentes sur la boîte est semblable (figure 15).

Le deuxième milieu testé est un milieu sélectif ne contenant pas d'uracile. Le contrôle positif de silençage (souche 23) est *ura*<sup>-</sup> et ne devrait donc pas pousser sur ce milieu privé d'uracile. Le contrôle négatif de silençage, quant à lui (souche SPQ01), étant *ura*<sup>+</sup> ne devrait avoir aucune difficulté à pousser sur ce milieu. Ces résultats sont ceux observés sur les boîtes. Pour les cultures issues des candidats de transformation de pAUS2 et pAUS9, on devrait observer une croissance sur milieu sans doxycycline, comme observé pour le contrôle négatif de silençage. En effet, le système RNAi n'est pas induit, l'ARNm du gène *ura4* est donc encore présent et la cellule est toujours prototrophe pour l'uracile. En présence de doxycycline par contre, la croissance de ces candidats devrait être très faible, voire nulle car le système RNAi est induit et éteint l'expression du gène *ura4*. L'observation des boîtes montre une croissance des candidats aussi bien en absence de drogue qu'en présence de celle-ci; le RNAi n'a donc pas été induit ou de manière non visible (figure 15).

---

Le troisième milieu testé est un milieu sélectif complet additionné d'un composé, le 5FoA (acide 5-Fluoro-orotique). Le 5FoA est transformé en 5-fluoro-orotidine monophosphate puis en 5-fluoro-uridine monophosphate (5-FUMP). Cette dernière étape est médiée par l'enzyme Ura4 chez *S. pombe*. Ce 5-FUMP est un inhibiteur de la thymidylate synthase et est très toxique pour la cellule. Seuls des mutants, où l'activité de l'enzyme que code *ura4* (orotidyl décarboxylase) est nulle ou faible, peuvent pousser sur un milieu 5-FoA.

Globalement donc, on s'attend à ce que le contrôle positif du silençage (souche 23) pousse sur ce milieu 5FoA et que les souches, où le silençage est efficace (donc les candidats transformants en présence de doxycycline), fassent de même. Au contraire, le contrôle négatif du silençage (souche SPQ01) et les mêmes souches, en absence de doxycycline, ne devraient pas pousser. L'observation des boîtes montre que les contrôles positif et négatif sont corrects mais que, aussi bien en absence qu'en présence de doxycycline, les transformants ne poussent pas (figure 14). Ceci indique que l'orotidyl décarboxylase qui est l'enzyme codée par *ura4* serait active et produit toujours le dérivé toxique au départ de 5FoA.



**Figure 15 :** Essais d'extinction du gène *ura4* par transformation des vecteurs pAUS2 et pAUS9 dans *S. pombe*. **a)** Transformations réalisées avec le pAUS2 (*ura4* antisens). **b)** Transformations réalisées avec le pAUS9 (grande "hairpin" *ura4*).

Un contrôle positif de silençage (souche 23), un contrôle négatif de silençage (souche SPQ01) et trois cultures issues de candidats de chaque transformation ont été étalés dans cet ordre de haut en bas sur des boîtes contenant différents milieux : milieu complet, milieu sans uracile et milieu complet additionné de 5FoA. Chaque milieu a également été réalisé sans et avec doxycycline (200 mg/l). Les cultures ont été déposées en différentes dilutions (1x, 10x, 100x et 1000x), dans cet ordre à partir de la gauche.



### 3.1.2 Analyse des résultats

Les résultats obtenus n'indiquent aucun effet dans le silençage puisque l'on n'observe pas de différence entre la croissance des transformants avec ou sans doxycycline et le contrôle négatif de silençage. Plusieurs hypothèses peuvent être émises pour expliquer ces résultats.

Une première hypothèse serait que le système RNAi a été induit mais l'expression du gène *ura4* n'a pas été complètement éteinte et le peu d'uracile produit pourrait être suffisant pour que la cellule croisse sur milieu sans uracile.

Une deuxième hypothèse se base sur l'existence d'une RNase qui ciblerait les siRNA chez *S. pombe* au fur et à mesure de l'induction en présence de doxycycline. Cette RNase a été évoquée au §1.2.4 de l'introduction. L'efficacité du système RNAi serait donc limitée par cette RNase. Néanmoins, le même genre d'expérience a déjà été réalisée avec succès chez *S. pombe* par l'équipe de Schramke mais sur une autre souche de levure et dans d'autres conditions de travail (Schramke *et al.*, 2003). La présence de siRNA pourrait être testée par un Northern-Blot réalisé sur des extraits cellulaires après induction du système RNAi dans ces mêmes cellules.

Une troisième hypothèse considère que le promoteur Tet ne serait pas actif dans la levure *S. pombe*. Cette hypothèse pourrait être vérifiée en plaçant une protéine fusionnée à un épitope sous le contrôle du promoteur Tet et de vérifier l'expression de cette protéine en Western-Blot. L'épitope permet une détection aisée de la protéine.

Une quatrième hypothèse serait que Ura4 est une protéine très stable et qu'elle serait encore présente en quantité suffisante pour permettre la croissance de la cellule pendant une certaine période après la dégradation de son ARNm. Pour tester cette hypothèse de la stabilité de Ura4, on pourrait tagger cette protéine avec un épitope et évaluer sa disparition au cours du temps par Western-Blot en présence de cycloheximide (un inhibiteur de la traduction qui agit au niveau des ribosomes).

Une dernière hypothèse envisage que les cellules mortes contiennent un peu d'Ura4. Cet Ura4 pourrait servir de source à des cellules voisines et permettre ainsi leur croissance.

### 3.2 siRNA synthétiques

Les siRNA (Eurogentec) ont été transformés par électroporation dans la levure *S. pombe* et le résultat de transformation a été étalé sur les différents milieux mentionnés plus haut, à savoir : milieu complet, milieu sans uracile et milieu complet avec 5-FoA.

Nous avons également transformé *S. pombe* par un contrôle négatif (Eurogentec). Nous nous attendions à observer une croissance des cellules sur milieu complet, pas de croissance sur milieu sans uracile et une croissance sur complet additionné de 5FoA. En fait, aucune croissance n'est observée sur les boîtes.

Cette électroporation était la première réalisée sur *S. pombe* dans le laboratoire. Elle a été effectuée en condition "RNase free" grâce à du DEPC 1 % (diéthyl pyrocarbonate). Il y aurait lieu de tester l'innocuité de ce produit sur *S. pombe* dans les conditions du test avant de refaire l'expérience de manière contrôlée.

## Conclusions

Le système d'interférence par ARN est utilisé pour éteindre l'expression d'un gène afin d'observer le phénotype qui en résulte et d'étudier la fonction de ce gène. Ce système est induit par la présence d'ARN double-brin qui est débité par le complexe Dicer en siRNA de 21-23 nucléotides. Ces siRNA sont ensuite incorporés dans le complexe RISC afin de le guider vers l'ARNm qui leur est homologue et de le dégrader. Il existe également un mécanisme d'amplification de ce système et une RNase qui dégrade les siRNA.

Le but de ce travail est de tester différents moyens d'induire ce système dans la levure *S. pombe* en prenant comme gène cible, le rapporteur *ura4*. Le moyen le plus efficace pourra ensuite être utilisé pour éteindre l'expression d'autres gènes.

Quatre techniques différentes ont été testées. La première technique utilise un plasmide contenant la séquence du gène *ura4* antisens sous le contrôle d'un promoteur régulable à la tétracycline ou doxycycline. La deuxième technique se base sur l'utilisation d'un plasmide contenant une séquence de 57 nucléotides codant une "hairpin" de 25 paires de bases et un linker de 7 nucléotides, sous le contrôle du même promoteur régulable. La troisième technique emploie un plasmide contenant une séquence de 770 nucléotides codant une "hairpin" de 350 paires de bases et un linker de 70 nucléotides, également sous le contrôle d'un promoteur régulable à la tétracycline. Enfin, la dernière technique vise à l'incorporation directe de siRNA synthétiques dans la cellule.

Le plasmide contenant la séquence codant une "hairpin" de 25 paires de bases n'a pas pu être obtenu. Les deux autres vecteurs, ainsi que les siRNA, ont été transformés dans *S. pombe* afin d'induire le système RNAi et trois candidats de chaque transformation ont été disposés sur différents milieux: avec et sans doxycycline (ou tétracycline). Aucune induction du système n'a pu être observée. Nous envisageons plusieurs hypothèses pour expliquer ce résultat.

Il se peut que le système RNAi ait été induit mais que l'expression du gène *ura4* n'ait pas été éteinte. La quantité d'Ura4 présente alors pourrait suffire à la cellule pour pousser.

Ura4 est peut-être une protéine très stable. Si c'est le cas, il faut un temps d'exposition des cellules au siRNA plus long pour pouvoir observer une extinction de la protéine. En effet, la protéine serait encore présente pendant une certaine période après l'induction de ce système, ce qui permettrait à la cellule de continuer à pousser.

Le promoteur tetO-CYC1 ne fonctionne peut-être pas dans la souche de *S. pombe* que nous avons testée. Les promoteurs CMV ou CYC1 ne sont peut-être pas actifs. L'activateur rtTA n'est peut-être pas transcrit ou traduit.

L'existence de RNase dépendant spécifiquement de siRNA peut être évoquée. En effet, cette RNase a été découverte chez *C. elegans* et nommée ERI-1 (cf. §1.2.4 de l'introduction). Elle se trouve essentiellement au niveau des gonades et du système nerveux central, là où justement le RNAi ne fonctionne pas bien. Un orthologue à cette RNase a également été trouvé chez *S. pombe*. Nous pouvons penser que cette enzyme se trouve en contact direct avec les siRNA introduits ou produits et les dégrade, diminuant ainsi l'efficacité du système RNAi.

Il est fort probable que l'explication ne se trouve pas dans une seule hypothèse mais plutôt dans plusieurs d'entre elles.

## Perspectives

Dans le cadre de ce mémoire, nous avons voulu mettre au point le système d'interférence à ARN afin d'éteindre des gènes d'intérêt chez *S. pombe*.

Les résultats attendus dans l'expérience pilote utilisant comme cible le silençage du rapporteur *ura4* n'ont pas été obtenus. Nous avons donc pensé à quelques perspectives à tester afin de savoir si ce sont les constructions qui n'induisent pas le système RNAi ou si c'est le système lui-même qui ne fonctionne pas dans nos cellules de *S. pombe*, même si des études semblables ont déjà été réalisées avec succès chez cette espèce (Schramke *et al.*, 2003).

Afin de vérifier l'expression et la production d'ARN des constructions *ura4* antisens et en "hairpin", nous pourrions réaliser un Northern-Blot (en utilisant une sonde spécifique à *ura4*, en sachant que l'on détectera également le messenger naturel (la souche est *ura*<sup>+</sup>)).

Nous pourrions également vérifier que le système "tétracycline" fonctionne chez *S. pombe* en plaçant un gène en fusion traductionnelle avec une séquence codant un épitope aisément détectable sous le contrôle du promoteur tetO-CYC1. Un Western-Blot nous montrera si la protéine X est exprimée, en utilisant des anticorps dirigés contre l'épitope.

Dans l'hypothèse où le siRNA synthétique commandé chez Eurogentec ne fonctionne pas, nous pourrions commander et tester un siRNA spécifique d'une autre région d'*ura4*.

De manière générale, l'énorme potentiel de la technique révélé par un nombre d'études en croissance exponentielle mais, dans un petit nombre de types cellulaires, incite fortement à développer le système dans notre modèle *S. pombe*. Les données rapportées par d'autres auteurs indiquent que l'expression fut tentée avec succès. Contact sera pris avec ces auteurs pour nous approprier cette technique avec les mêmes chances de succès.

## Matériel et méthodes

### 1. Matériel

#### 1.1 Les tampons

Nom	Composition	Concentration	Remarques
Tampon de lyse	Triton 100x SDS NaCl Tris HCl pH 8 EDTA pH 8	2 % 1 % 100 mM 10 mM 1 mM	
Tampon S1	Tris HCl pH 8 EDTA pH 8 RNase A	50 mM 10 mM 100 mg/ml	Cette solution doit être conservée à 4°C.
Tampon S2	NaOH SDS	200 mM 1 %	
Tampon S3	Kac pH 5,5	3 M	
Tampon TAE 10x	Tris-Acétate EDTA pH 8	400 mM 10 mM	
Tampon TE 10x	Tris-HCl pH 7,5 EDTA pH 7,5	100 mM 10 mM	Autoclaver.
Acétate de lithium (LiAc)	LiAc pH 7,5	1 M	Autoclaver.
Polyéthylène glycol (PEG) 4000	PEG	50 %	Autoclaver.
Ampicilline 1000 x	Ampicilline	100 mg/ml	A dissoudre dans de l'eau bidistillée et filtrer sur filtre millipore 0,22 mm.
Chloramphénicol 1000 x	Chloramphénicol	20 mg/ml	Dissoudre dans de l'éthanol.
Kanamycine 1000 x	Kanamycine	30 mg/ml	Dissoudre dans de l'eau bidistillée et filtrer sur filtre millipore 0,22 mm.
Tétracycline	Tétracycline	20 mg/l	Dissoudre dans du méthanol.
Doxycycline	Doxycycline	100 mg/l	Dissoudre dans de l'eau bidistillée et filtrer sur filtre millipore 0,22 mm.

#### 1.2 Les solutions

Acides aminés et bases azotées

Adénine sulfate 50x	375 mg/100 ml
Uracile 100x	100 mg/100 ml
Lysine 100x	750 mg/100 ml
L-Histidine-HCl 100x	750 mg/100 ml
Leucine 50x	1250 mg/100 ml

Porter séparément à volume avec de l'eau distillée puis autoclaver.

## ADN de sperme de saumon (ssDNA)

Dissoudre 20 mg de ssDNA (Sigma ref. D-1626) dans 10 ml de TE 1x. Passer 20x dans une seringue pour réduire la taille des brins grâce aux forces de cisaillement. Aliquoter par millilitre et faire bouillir l'ADN 10 minutes à 100°C. Conserver à - 20°C.

Avant chaque utilisation, dénaturer à 100°C pendant 5 min puis mettre sur glace pour garder l'ADN dénaturé.

## Agarose

Agarose 0,5; 1 ou 2 g (fonction du %age du gel)

Porter à un volume de 100 ml avec du TAE 1x. Porter à ébullition et laisser refroidir à une température de 55°C. Couler ensuite le gel sur un support approprié, après avoir incorporé le bromure d'éthidium (5 ml/ 100 ml d'une solution stock).

## Solution LiAc/TE 1x

LiAc 1 M	1/10ème de volume
TE 10x	1/10ème de volume
H <sub>2</sub> O	8/10ème de volume

## Solution LiAc/TE/PEG 4000

LiAc 1 M	1/10ème de volume
TE 10x	1/10ème de volume
PEG 50 %	8/10ème de volume

Solution CaCl<sub>2</sub>

CaCl <sub>2</sub>	60mM
Glycérol	15 %

## Solution de X-Gal (1000x)

X-Gal	2 %
-------	-----

Dissoudre dans du NN' diméthylformamide. Conserver à -20°C.

## Solution d'IPTG (Isopropyl-b-D thiogalactopyranoside) (1000x)

IPTG	100 mM
------	--------

Dissoudre dans de l'eau et filtrer sur filtre millipore 0,22 mm.

## Alourdisseur/colorant pour gels d'agarose (10 ml)

Bleu de bromophénol 0,25 %	25 mg
EDTA 25 mM	0,5 ml EDTA 0,5 M
Glycérol 50 %	5 ml
Eau distillée	4,5 ml

## Marqueurs de poids moléculaires pour gel d'agarose

Le marqueur utilisé est l'Hyperladder fourni par la firme Bioline. La solution fournie est prête à l'emploi. Pour un gel, 5 ml de la solution sont utilisés.

## Bromure d'éthidium

2 mg/ml d'eau distillée

Milieu LB (Luria Bertani) solide.

Tryptone	10 g/l
NaCl	5 g/l
Yeast Extract	5 g/l
Agar	20 g/l

Porter à volume avec de l'eau distillée puis autoclaver. Laisser refroidir le milieu à une température de 55°C et couler les boîtes de Petri. Conserver celles-ci à 4°C. Pour du LB liquide, ne pas ajouter d'agar.

L'ampicilline, la kanamycine ou le chloramphénicol peuvent être ajoutés à une concentration finale de 100 mg/ml au milieu LB liquide ou solide ayant été autoclavé, puis refroidi à une température de 55°C.

SOC

Tryptone	2 %
Yeast extract	0,5 %
NaCl	10 mM
KCl	2,5 mM
MgCl <sub>2</sub>	10 mM
Glucose	20 mM

Autoclaver, ensuite ajouter du MgSO<sub>4</sub> (filtré stérilement) jusqu'à une concentration de 10 mM.

Milieu YES (Yeast Extract Supplemented)

Yeast Extract	5 g/l
Dextrose	30 g/l
Agar	20 g/l
His, Leu, Ade, Ura, Lys	50 mg/l

Porter à volume avec de l'eau distillée puis autoclaver. Laisser refroidir le milieu à une température de 55°C et couler les boîtes de Petri. Conserver celles-ci à 4°C. Pour du YES liquide, ne pas ajouter d'agar.

Milieu EMM (Edimburg Minimal Medium)

EMM (Q-BIO gene n°4110-032 )	32 g/l
Agar	20 g/l

Porter à volume avec de l'eau distillée puis autoclaver. Laisser refroidir le milieu à une température de 55°C et couler les boîtes de Petri. Conserver celles-ci à 4°C. Pour du EMM liquide, ne pas ajouter d'agar.

La tétracycline ou la doxycycline ainsi que les suppléments (lysine, leucine, histidine, uracile et adénine) peuvent être ajoutés au milieu EMM ayant été autoclavé, puis refroidi à une température de 55°C.

### 1.3 Souches et plasmides

#### 1.3.1 Souches de bactéries (E.coli)

##### **DH 10B**

*F<sup>-</sup> mcrA*, *D(mrr-hsdRMS-mcrBC)*, *f80dlacZDM15*, *DlacX74*, *deoR*, *recA1*, *endA1*, *araD139*, *D(ara, leu)7697*, *galU*, *galK*, *l<sup>-</sup>*, *rspL*, *nupG*.

Cette souche possède les caractéristiques suivantes!:

- *recA1* réduit la recombinaison au millième de son taux normal, minimisant ainsi la recombinaison entre ADN endogène et exogène,
- *endA1* améliore le rendement et la qualité des préparations d'ADN plasmidique en diminuant le taux d'endonucléases,!
- *Dlac* est une délétion de l'opéron lactose qui la rend incapable de métaboliser le lactose.

Cette souche est sensible au gène *ccdB*.

### **DB 3.1**

*F<sup>-</sup>, gyrA462, endA<sup>-</sup>, D(Sr1-recA), mcrB, mrr, hsdS20(r<sub>B</sub><sup>-</sup>, m<sub>B</sub><sup>-</sup>), supE44, ara-14, galK2, lacY1, proA2, rpsL20(Sm<sup>r</sup>), xyl-5, l<sup>-</sup>, leu, mtl-1.*

Cette souche possède l'allèle *gyrA462* qui la rend résistante à l'effet toxique de *ccdB*.

## **1.3.2 Souches de levures**

### **SPQ01**

*h<sup>+</sup>, leu1-32.*

### **Souche 23**

*h<sup>-</sup>, ade6-210, ura4-D18, leu1-32.*

## **1.3.3 Plasmides**

### **pDONR-201**

Ce plasmide porte un gène de résistance à la kanamycine ainsi qu'une cassette composée du gène *ccdB* et d'un gène de résistance au chloramphénicol (figure 1a). Ce plasmide est utilisé dans le système Gateway<sup>™</sup> (et Multisite Gateway<sup>™</sup>) pour effectuer la réaction BP.

### **pDONR P4-P1R**

Ce plasmide porte un gène de résistance à la kanamycine, ce qui permet la sélection des transformants (figure 1b). Ce plasmide est utilisé dans le système Multisite Gateway<sup>™</sup> pour effectuer la réaction BP.

### **pGEM-t easy**

Ce plasmide est utilisé pour cloner des produits PCR. Il est linéarisé en *EcoRV* et possède des T protrudants à ses 2 extrémités 3' et est coupé au milieu du gène *LacZ* (figure 1c).

La polymérase ajoute des A aux extrémités 5' des produits PCR, ce qui permet un clonage facile dans le pGEM-t easy. La sélection des bons candidats s'effectue sur boîtes contenant du X-Gal et de l'IPTG. Si le produit PCR a été cloné dans le plasmide, le gène *lacZ* sera disrupté et les colonies seront blanches. Si le plasmide s'est refermé sur lui-même, le gène *lacZ* est complet et clivera le X-Gal en galactose et en un produit X bleu. Les colonies apparaîtront donc bleues.

**pMAD1**

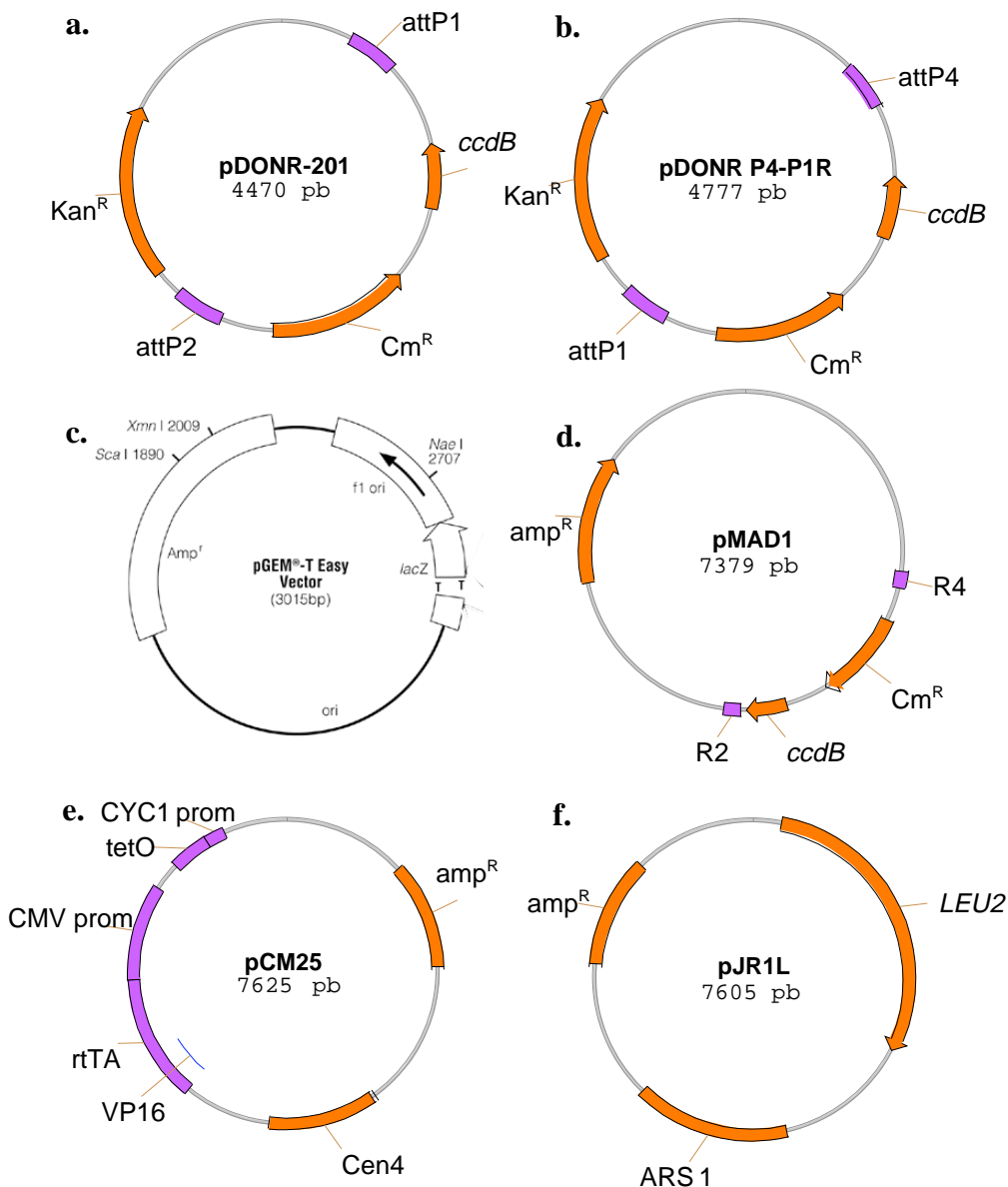
Plasmide contenant la cassette attR4-attR2 du système Multisite Gateway™. Cette cassette comprend le gène toxique *ccdB* et le gène de résistance au Chloramphénicol ( $\text{Cm}^R$ ) (figure 1d).

**pCM252**

Plasmide porteur du promoteur régulateur à la tétracycline et commandé chez Euroscarf (figure 1e).

**pJR1L**

Plasmide de *S. pombe* contenant le gène *LEU2*, le gène *bla* de résistance à l'ampicilline (ici représenté par  $\text{amp}^R$ ) et une origine de répllication de *S. pombe*, ARS1 (figure 1f).



**Figure 1 :** a) Plasmide pDONR-201. b) Plasmide pDONR P4-P1R. c) Plasmide pGEM-t easy. d) Plasmide pMAD1. e) Plasmide pCM252. f) Plasmide pJR1L.



## 2. Méthodes

### 2.1 Techniques relatives à l'utilisation de bactéries

#### 2.1.1 Transformation par choc thermique $\text{CaCl}_2$

Cette méthode consiste à soumettre les bactéries à un choc thermique. La différence de température déstabilise la membrane cellulaire, ce qui permet à l'ADN plasmidique de rentrer dans la bactérie.

#### Préparation des cellules compétentes

- Lancer une préculture d'*E. coli* dans 50 ml de milieu LB pendant une nuit à 37°C.
- Inoculer dans 400 ml de milieu LB et laisser pousser jusqu'à l'obtention d'une  $\text{D.O}_{600\text{nm}}$  de 0,375.
- Répartir les 400 ml dans deux récipients de 200 ml et laisser sur glace 10 minutes.
- Centrifuger 7 minutes à 3000 rpm à 4°C.
- Oter les surnageants et resuspendre les culots dans 40 ml de  $\text{CaCl}_2$  froid.
- Centrifuger 5 minutes à 2500 rpm à 4°C.
- Resuspendre les culots dans 40 ml de  $\text{CaCl}_2$  et laisser 30 minutes sur glace.
- Centrifuger 5 minutes à 2500 rpm à 4°C.
- Resuspendre les culots dans 8 ml de  $\text{CaCl}_2$  froid.
- Aliquoter par 200 µl dans des tubes Eppendorf froids.
- Stocker les cellules à -80°C.

#### Transformation

- Dégeler les cellules compétentes sur glace.
- Dans un tube Eppendorf stérile froid, mélanger les 200 µl de cellules compétentes avec le plasmide ou le produit de "ligation".
- Laisser 20 minutes sur glace.
- Soumettre les cellules à un choc thermique en incubant 2 minutes à 42°C.
- Ajouter 1 ml de LB liquide pour permettre aux cellules de récupérer.
- Incuber 45 minutes à 37°C.
- Centrifuger 3 minutes à 8000 rpm.
- Resuspendre les cellules dans 200 µl de milieu LB.
- Etaler sur milieu LB avec ampicilline ou un autre antibiotique et incuber une nuit à 37°C.

#### 2.1.2 Transformation par électroporation

Cette méthode consiste à soumettre les bactéries à un choc électrique. Cette décharge déstabilise la membrane cellulaire, ce qui entraîne la formation de pores dans celle-ci, permettant ainsi à l'ADN plasmidique de rentrer dans la bactérie.

#### Préparation des cellules électrocompétentes

- Lancer une préculture de la souche d'*E. coli* pendant une nuit à 37°C dans 5 ml de milieu LB sous forte agitation.
- Inoculer 800 µl de milieu LB avec la préculture.
- Incuber à 37°C sous agitation jusqu'à l'obtention d'une  $\text{D.O}_{600\text{nm}}$  comprise entre 0,5 et 1.
- Centrifuger la culture 15 minutes à 4000 rpm et 4°C.

- Resuspendre le culot dans 800 ml d'eau stérile à 4°C.
- Centrifuger la culture 15 minutes à 4000 rpm et 4°C.
- Resuspendre le culot dans 400 ml d'eau stérile à 4°C.
- Centrifuger la culture 15 minutes à 4000 rpm et 4°C.
- Resuspendre le culot dans 20 ml de glycérol 10 % à 4°C.
- Centrifuger la culture 15 minutes à 4000 rpm et 4°C.
- Resuspendre le culot dans 2 ml de glycérol 10 % à 4°C.
- Aliquoter dans des Eppendorfs par 50 ml.
- Stocker les cellules à -80°C.

## **L'électroporation**

- Dégeler un aliquot sur glace.
- Stériliser les cuvettes d'électroporation en les plaçant sur le banc à UV pendant 3 minutes.
- Mettre les cuvettes sur glace.
- Mélanger dans un Eppendorf 50 ml de cellules électrocompétentes et 1 à 10 ml d'ADN préalablement dialysé (sur membrane 0,025 mm).
- Laisser une minute sur glace.
- Transférer le mélange dans la cuvette et remettre sur glace.
- Régler l'électroporateur (Gene Pulser) sur 25 mF; 2,3 kV et 200 W.
- Placer la cuvette dans la chambre d'électroporation et électroporer.
- Ajouter immédiatement après l'électroporation 1 ml de SOC.
- Incuber 45 minutes à 37°C.
- Centrifuger et resuspendre le culot dans 200 ml de SOC.
- Etaler sur des boîtes de milieu sélectif.

## **2.2 Techniques relatives à l'ADN**

### **2.2.1 La PCR ou "Polymérase Chain Reaction"**

Différents éléments doivent être mis en présence :

- l'ADN d'intérêt.
- les déoxynucléotides : 2 ml d'une solution concentrée 20 nmoles/ml.
- les amorces oligonucléotidiques (concentration de 0,01nmole/ml) : 2,5 ml.
- le tampon de PCR (10X) : 5 ml.
- l'enzyme : 1 ml (l'activité est de 2 unités/ml).
- l'eau stérilisée afin d'arriver au volume désiré de 50 ml.

Un contrôle négatif doit être réalisé afin d'éliminer toute amplification liée à une contamination d'un des composants de la PCR. Dans le tube contrôle, on retrouve tous les réactifs à l'exception de l'ADN qui sera remplacé à volume égal par de l'eau stérile. Ce contrôle sera soumis au même processus de cycle de température que les autres tubes.

### **2.2.2 L'électrophorèse sur gel d'agarose**

*Première étape : couler un gel*

Mélanger l'agarose : %age en fonction des bandes à séparer, du TAE 1x. et du bromure d'éthidium (5 ml/100 ml) et dissoudre l'agarose en chauffant. Couler le mélange dans un support et y ajouter les peignes adéquats.

### *Deuxième étape: migration*

Le voltage et le temps de migration sont choisis en fonction des bandes à séparer.

### *Troisième étape : visualiser les bandes aux ultraviolets*

Le bromure d'éthidium est une molécule qui absorbe l'énergie lumineuse à une longueur d'onde de 302 nm (dans les ultraviolets), celui-ci va s'intercaler dans la double hélice de l'ADN et la rendre visible lorsqu'elle est exposée aux U.V.

### **2.2.3 Récupération de l'ADN à partir d'un gel d'agarose (Kit MBI Fermentas)**

- Couper la bande du gel contenant l'ADN d'intérêt sur banc U.V. pour la visualiser.
- Peser la bande et y ajouter trois fois le volume de Binding solution (NaI).
- Incuber 5 min. à 55°C.
- Ajouter de 5 ml à 10 ml (en fonction de la concentration de l'ADN) de poudre de silice et vortexer.
- Incuber 5 min. à 55°C.
- Centrifuger 30 secondes à 13200 rpm et ôter le surnageant.
- Ajouter 500 µl de Washing buffer.
- Centrifuger 30 secondes à 13200 rpm et ôter le surnageant.
- Ajouter 500 µl de Washing buffer.
- Centrifuger 5 secondes à 13200 rpm et ôter le surnageant.
- Ajouter 8 ml d'eau et incuber 5 min. à 55°C.
- Centrifuger 30 secondes à 13200 rpm.
- Transférer le surnageant dans un nouvel Eppendorf.
- Ajouter 8 ml d'eau au culot et incuber 5 min. à 55°C.
- Centrifuger 30 secondes à 13200 rpm.
- Transférer le surnageant dans le même Eppendorf.

### **2.2.4 Déphosphorylation d'ADN plasmidique restreint**

Une déphosphorylation est souvent nécessaire sur de l'ADN plasmidique restreint à bouts francs. Elle évite que la matrice se referme sur elle-même et donc, favorise la "ligation" avec l'insert choisi.

### **Réalisation pratique**

- Inactivation de l'enzyme de restriction 15 minutes à 65°C.
- Ajouter 1 µl de SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase) et 2 µl de tampon 10x de la SAP.
- Incuber 30 minutes à 37 °C puis rajouter 1 µl de SAP.
- Incuber 30 minutes à 37 °C.
- Incuber 15 minutes à 65°C pour inactiver l'enzyme.
- Récupérer l'ADN en le faisant passer sur gel.

### **2.2.5 Minipréparation d'ADN plasmidique**

#### **2.2.5.1 Minipréparations classiques**

- Ensemencer 5 ml de milieu liquide (LB + antibiotiques) avec une colonie isolée.
- Incuber la culture liquide une nuit à 37°C sous forte agitation.
- Centrifuger 1,5 ml de la culture dans un Eppendorf pendant 1 minute à 12500 rpm et éliminer le milieu de culture.
- Resuspendre le culot bactérien dans 250 µl de solution S1.
- Ajouter 250 µl de solution S2 et mélanger par inversion, incuber 5 minutes à température ambiante.
- Ajouter 300 µl de solution S3 et mélanger par inversion.
- Centrifuger 20 minutes à 4°C (à 14000 rpm) et récupérer le surnageant dans de nouveaux tubes.
- Précipiter l'ADN en ajoutant 480 µl d'isopropanol, homogénéiser.
- Centrifuger 20 minutes à 4°C à 14000 rpm puis éliminer le surnageant.
- Laver l'ADN, en ajoutant 500 µl d'éthanol 70 % et centrifuger 5 minutes à 4°C (à 14000 rpm). Éliminer prudemment l'éthanol.
- Sécher le culot d'ADN.
- Resuspendre dans 30 µl d'H<sub>2</sub>O distillée.

#### **2.2.5.2 Minipréparations sur colonnes (Kit NucleoSpin® de la firme MN)**

- Ensemencer 5 ml de milieu liquide (LB + antibiotiques) avec une colonie isolée.
- Incuber la culture liquide une nuit à 37°C sous forte agitation.
- Centrifuger 1,5 ml de la culture dans un Eppendorf (pendant 5 minutes à 12500 rpm) et éliminer le milieu de culture.
- Resuspendre le culot bactérien dans 250 µl de A1.
- Ajouter 250 µl de A2 et mélanger doucement en retournant, incuber 5 minutes à température ambiante.
- Ajouter 250 µl de A3 et mélanger doucement en retournant.
- Centrifuger 10 minutes à 11000 rpm et transférer le surnageant dans une colonne mise au préalable dans un tube collecteur de 2 ml.
- Ajouter 600 µl de A4 sur la colonne.
- Centrifuger une minute à 11000 rpm et vider le tube collecteur.
- Recentrifuger 2 minutes à 11000 rpm pour bien sécher la membrane de silice de la colonne.
- Placer la colonne dans un tube Eppendorf et ajouter 50 µl de AE sur la colonne.
- Centrifuger une minute à 11000 rpm.

### **2.2.6 Restriction d'ADN plasmidique**

- Dans un tube Eppendorf, mélanger l'ADN à restreindre, 1/10<sup>ème</sup> du volume du tampon de restriction concentré 10x et l'enzyme puis porter à volume (généralement 20 µl) avec de l'eau distillée.
- Incuber 1 heure à température optimale pour l'enzyme (généralement 37°C).
- Si nécessaire, inactiver l'enzyme par chauffage (15 à 20 minutes à 65°C pour une enzyme thermosensible).

### 2.2.7 Réaction de "ligation"

- Mélanger dans un tube Eppendorf les fragments d'ADN à liguer, 1/5<sup>ème</sup> du volume final de tampon de "ligation" 5x ainsi que 1 ml de ligase.
- Compléter avec de l'eau distillée stérile.
- Incuber 2 heures à 25°C ou une nuit à 16°C pour des bouts francs.
- Réaliser également un contrôle négatif dans lequel l'insert n'est pas ajouté.

### 2.2.8 La réaction de "ligation" avec le pGEM-t easy

Réactifs	Volumes
Tampon de "ligation" (2x)	5 ml
PGEM-t easy (50 ng)	1 ml
Produit PCR	environ 50 ng (1-2 ml)
T4 DNA ligase (3 U/ml)	1 ml
Eau distillée	pour arriver à un volume final de 10 ml

- Mettre tous les réactifs en présence et incuber une heure à température ambiante.

### 2.2.9 Extraction d'ADNg de levure

- Ensemencer 10 ml de milieu liquide YES avec une colonie isolée.
- Incuber la culture liquide une nuit à 32°C sous agitation (incuber deux nuits si la culture doit être très grasse).
- Centrifuger 5 minutes à 3000 rpm et éliminer le milieu de culture.
- Resuspendre les cellules dans 500 ml d'eau et transférer le tout dans un tube Eppendorf.
- Centrifuger 5 minutes à 3000 rpm et éliminer le surnageant.
- Resuspendre les cellules dans 200 ml de Tampon de lyse, 200 ml de billes de verre et 200 ml de phénol/chloroforme/alcool isoamylique 25:24:1 pH 6,6.
- Vortexer 3 minutes et ajouter 200 ml de TE pH 8.
- Vortexer puis centrifuger 5 minutes à 3000 rpm.
- Récupérer la phase aqueuse dans un nouveau tube.
- Ajouter 1 ml d'éthanol 100 % froid.
- Vortexer puis centrifuger 3 minutes à 13000 rpm.
- Oter le surnageant et resuspendre le culot dans 400 ml de TE pH 8.
- Ajouter 30 ml de RNase A à 1 mg/ml et incuber 10 minutes à 37°C.
- Ajouter 10 ml de NH<sub>4</sub>Ac 4 M et 1 ml d'éthanol 100 % froid.
- Mixer par inversion et centrifuger 3 minutes à 13000 rpm.
- Oter le surnageant et sécher le culot.
- Resuspendre le culot dans 50 ml d'eau.

### 2.2.10 Clonage Multisite Gateway™

#### Réaction de BP clonage

Réactifs	Volumes
Tampon BP (5x)	2 ml
pDONR 201 ou pDONR P4-P1R (100 ng)	1 ml
Produit PCR	2 ml
TE 1X 10 mM, pH 8.0	3 ml
BP Clonase™	2 ml

- Sortir la BP Clonase™ au dernier moment. Laisser décongeler sur glace (ou sur carboglace), prélever le volume nécessaire et remettre au congélateur (-80°C) immédiatement après utilisation. Pipeter pour mélanger. Veiller néanmoins à éviter la formation de bulles (tampon et solution de BP Clonase™ très visqueux).
- Laisser la réaction se réaliser au minimum 5 heures à 25°C.
- Prendre 2 ml du mélange de BP Clonage pour transformer 200 ml de bactéries (souche DH10B).
- Etaler 200 ml de la transformation sur boîte LB Kan.

#### Réaction de LR Clonage Plus

Réactifs	Volumes
Tampon LR Plus (5x)	2 ml
Vecteurs d'entrée	3 ml
Vecteur de destination restreint (100 ng)	2 ml
LR Clonase Plus™	2 ml

- Sortir la LR Clonase Plus™ au dernier moment. Laisser décongeler sur glace (ou sur carboglace). Prélever le volume nécessaire et remettre au congélateur (-80°C) immédiatement après utilisation. Pipeter pour mélanger. Veiller néanmoins à éviter la formation de bulles (tampon et solution de LR Clonase Plus™ très visqueux).
  - Laisser la réaction se réaliser pendant la nuit.
- Pour arrêter la réaction de clonage, ajouter 1 ml de protéinase K (2 mg/ml dans de l'eau), incuber 10 minutes dans un bain-marie à 37°C.
- Prendre 2 ml du mélange de LR Clonage Plus pour transformer 200 ml de bactéries (souche DH10B).

## 2.3 Techniques relatives à l'utilisation des levures

### 2.3.1 Transformation de levures par choc thermique

#### Principe

Cette procédure permet de transformer des levures avec un, voire deux plasmides en même temps.

L'acétate de lithium, le PEG et le choc thermique perméabilisent la membrane, ce qui permet des mouvements de molécules vers l'intérieur ou vers l'extérieur de la cellule. L'ADN de sperme de saumon (ssDNA) dénaturé augmente l'efficacité de transformation car il offre une fonction de "carrier" à l'ADN plasmidique.

### Réalisation pratique

- Inoculer 10 ml de milieu YES (milieu riche) avec la souche de levure désirée et incubé sous agitation toute la nuit à 32°C.
- Inoculer une culture de 50 ml du même milieu avec un petit volume de la préculture et incubé à 32°C sous agitation jusqu'à l'obtention d'une D.O<sub>600nm</sub> de 0,4 - 0,5.

Pour chaque transformation :

- Transférer 10 ml de culture dans un tube de 50 ml stérile et centrifuger 5 minutes à 5000 rpm. Oter le surnageant.
- Resuspendre le culot dans 50 ml d'eau stérile.
- Centrifuger 5 minutes à 5000 rpm. Oter le surnageant.
- Resuspendre les cellules dans 1 ml d'eau stérile et transférer le tout dans un tube Eppendorf.
- Centrifuger 30 secondes à 10000 rpm. Oter le surnageant.
- Resuspendre les cellules dans 1 ml de LiAc/TE.
- Centrifuger 30 secondes à 10000 rpm. Oter le surnageant.
- Resuspendre les cellules dans 100 µl de LiAc/TE.
- Ajouter de 1 à 5 µg d'ADN à transformer et 2 µl de ssDNA concentré (10 µg/ml).
- Incuber 10 minutes à température ambiante.
- Ajouter 260 µl de LiAc/TE/PEG.
- Incuber 20 minutes à 32°C.
- Ajouter 43 µl de DMSO (diméthyl sulfoxide) pré-chauffé à 42°C.
- Incuber 5 minutes à 42°C.
- Centrifuger 5 minutes à 5000 rpm.
- Resuspendre le culot dans 300 µl d'eau stérile.
- Étaler le produit de la transformation sur 2 boîtes de milieu adéquat.

#### 2.3.2 Transformation de levures par électroporation

- Inoculer 10 ml de milieu YES (milieu riche) avec la souche de levure désirée et incubé sous agitation toute la nuit à 32°C.
- Inoculer une culture de 50 ml du même milieu (ou 10ml par transformation à effectuer) avec un petit volume de la préculture et incubé à 32°C sous agitation jusqu'à l'obtention d'une D.O<sub>595nm</sub> de 0,5.

Pour chaque transformation :

- Transférer 10 ml de culture dans un tube de 50 ml stérile et centrifuger 5 minutes à 3000 rpm. Oter le surnageant.
- Resuspendre le culot dans 10 ml d'eau stérile à 4°C.
- Centrifuger 5 minutes à 3000 rpm. Oter le surnageant.
- Resuspendre le culot dans 10 ml de sorbitol 1M à 4°C.
- Centrifuger 5 minutes à 3000 rpm. Oter le surnageant.
- Resuspendre le culot dans 100 µl de sorbitol 1M à 4°C.
- Transférer le mélange dans une cuvette contenant l'ADN ou ARN (100 ng) pour la transformation, placer 5 minutes sur glace.
- Régler l'électroporateur (Gene Pulser) sur 25 µF; 1,5 kV et 200 W.
- Placer la cuvette dans la chambre d'électroporation et électroporer.
- Ajouter immédiatement après l'électroporation 0,9 ml de sorbitol froid 1M à 4°C.
- Étaler sur des boîtes de milieu minimum et incubé à 32°C.

## Bibliographie

Agrawal, N., Dasaradhi, P.V., Mohmmmed, A., Malhotra, P., Bhatnagar, R.K. & Mukherjee, S.K. RNA interference: biology, mechanism, and applications. *Microbiol Mol. Biol. Rev.* **67**(4), 657-685 (2003).

Arenz, C. & Schepers, U. RNA interference: from an ancient mechanism to a state of the art therapeutic application? *Naturwissenschaften* **90**, 345-359 (2003).

Belli, G., Gari, E., Piedrafita, L., Aldea, M. & Herrero, E. An activator/repressor dual system allows tight tetracycline-regulated gene expression in budding yeast. *Nucleic Acids Res.* **26**(4), 942-947 (1998).

Bernstein, E., Caudy, A., Hammond, S. M. & Hannon, G. J. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* **409**, 363-366 (2001).

Bernstein, E., Denli, A.M. & Hannon, G.J. The rest is silence. *RNA* **11**, 1509-1521 (2001).

Braus, G., Argast, M. & Beck, C.F. Identification of additional genes on transposon Tn10: tetC and tetD. *J Bacteriol.* **160**(2), 504-509 (1984).

Brenner, S. & Miller, J.H. Encyclopedia of Genetics. *Academic Press* **3**, 1706-1709 (2002).

Brummelkamp, T.R., Bernards, R. & Agami, R. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* **296**, 550-553 (2002).

Denli, A.M. & Hannon, G.J. RNAi: an ever-growing puzzle. *Trends Biochem. Sci.* **4**, 196-201 (2003).

Elbashir, S. M., Lendeckel, W. & Tuschl, T. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev.* **15**, 188-200 (2001).

Faryar, K. & Gatzm C. Construction of a Tetracycline-inducible promoter in *Schizosaccharomyces pombe*. *Curr Genet.* **4-5**, 345-349 (1992).

Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E. & Mello, C.C. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**, 806-811 (1998).

Gari, E., Piedrafita, L., Aldea, M. & Herrero, E. A set of vectors with a tetracycline-regulatable promoter system for modulated gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **9**, 837-348 (1997).

Gossen, M., Freundlieb, S., Bender, G., Muller, G., Hillen, W. & Bujard, H. Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. *Science* **268**(5218), 1766-1769 (1995).

Grewal, S. & Moazed, D. Heterochromatin and Epigenetic Control of Gene Expression. *Science* **301**, 798-802 (2003).



- Hamilton, A.J. & Baulcombe, D.C. A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* **286**(5441), 950-952 (1999).
- Hammond, S.M., Bernstein, E., Beach, D. & Hannon, G.J. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* **404**(6775), 293-296 (2000).
- Hannon, G.J. RNA interference. *Nature* **418**, 244-251 (2002).
- Kanemaki, M., Sanchez-Diaz, A., Gambus, A. & Labib K. Functional proteomic identification of DNA replication proteins by induced proteolysis *in vivo*. *Nature* **423**, 720-724 (2003).
- Kennedy, S., Wang, D & Ruvkun, G. A conserved siRNA-degrading RNase negatively regulates RNA interference in *C. elegans*. *Nature* **427**, 645-649 (2004).
- Li, W.X., Ding, S.W. Viral suppressors of RNA silencing. *Curr Opin Biotechnol.* **2**, 150-154 (2001).
- Liu, Q., Rand, T.A., Kalidas S., Du, F., Kim, H.E., Smith D.P. & Wang, X. R2D2, a bridge between the initiation and effector steps of the *Drosophila* RNAi pathway. *Science* **301**, 1921-1925 (2003).
- McManus, M.T & Sharp P.A. Gene silencing in mammals by small interfering RNAs. *Nat. Rev. Genet.* **10**, 737-747 (2002).
- Raponi, M. & Arndt, G. M. Double-stranded RNA-mediated gene silencing in fission yeast. *Nucleic Acids Res.* **31**, 4481-4489 (2003).
- Schramke, V. & Allshire, R. Hairpin RNAs and retrotransposon LTRs effect RNAi and chromatin-based gene silencing. *Science* **301**(5636), 1069-1074 (2003).
- Schütze, N. siRNA technology. *Mol Cell Endocrinol.* **213**(2), 115-119 (2004).
- Schwarz, D. S., Hutvagner, G., Haley, B. & Zamore, P. D. Evidence that siRNAs function as guides, not primers, in the *Drosophila* and human RNAi pathways. *Mol. Cell* **10**, 537-548 (2002).
- Schwarz, D.S., Tomari, Y. & Zamore, P.D. The RNA-Induced Silencing Complex is a Mg(2+)-Dependent Endonuclease. *Curr Biol.* **14**(9), 787-791 (2004).
- Sen, G., Wehrman, T.S., Myers, J.W. & Blau, H.M. Restriction enzyme-generated siRNA (REGS) vectors and libraries. *Nat Genet.* **36**(2), 183-189 (2004).
- Sijen, T., Fleenor, J., Simmer, F., Thijssen, K.L., Parrish, S., Timmons, L., Plasterk, R.H. & Fire, A. On the role of RNA amplification in dsRNA-triggered gene silencing. *Cell* **107**(4), 465-476 (2001).

Tijsterman, M. & Plasterk, R.H.A. Dicers at RISC: The Mechanism of RNAi. *Cell* **117**(1), 1-3 (2004).

Walhout, A.J.M., Temple, G.F., Brash, M.A., Hartley, J.L., Lorson, M.A., Van den Heuvel, S. & Vidal, M. GATEWAY Recombinational Cloning: Application to the Cloning of Large Numbers of Open Reading Frames or ORFeomes. *Methods in Enzymology* **328**, 575-592 (2000).

Waterhouse, P.M., Wang, M.B. & Lough, T. Gene silencing as an adaptive defence against viruses. *Nature* **411**(6839), 834-842 (2001).

Watson, J., Baker, T., Bell, S., Gann, A., Levine, M. & Losick, R Molecular Biology of the Gene (International Edition) - 5th Edition. *Pearson Education*, 567-573 (2004).

Zamore, P.D., Tuschl, T., Sharp, P.A. & Bartel, D.P. RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell* **101**, 25-33 (2000).